

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045935**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.01.19**

(21) Номер заявки  
**202092847**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.05.21**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛА К CD3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**(31) **62/676,081**(32) **2018.05.24**(33) **US**(43) **2021.04.20**(86) **PCT/IB2019/054188**(87) **WO 2019/224717 2019.11.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Годе Франсуа, Джайлс-Комар Джилл,  
Хайдрих Бредли, Хуан Чичи, Кейн  
Коллин (US), Макдейд Ронан (GB),  
Немет-Сизэй Дженнифер (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,  
Соколов Р.А. (RU)**

(56) **EP-A1-2982693****WO-A1-2015181098**

**PAN YING ET AL.:** "Anti-idiotypic antibodies: Biological function and structural studies", THE FASEB JOURNAL, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 9, № 1, 1 January 1995 (1995-01-01), p. 43-49, XP002526815, ISSN: 0892-6638, the whole document, in particular, the abstract

**Www.Rockland-Inc.Com:** "Anti-Idiotypic Antibody Production Service", 12 November 2019 (2019-11-12), XP055642733, retrieved from the Internet: URL: <https://rockland-inc.com/anti-idiotypic-antibody-production.aspx> [retrieved on 2019-11-14], the whole document, in particular, the first paragraph

**HEINZ KOHLER ET AL.:** "The Promise of Anti-idiotypic Revisited", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 10, 1 April 2019 (2019-04-01), XP055642738, CH, ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2019.00808, the whole document

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают PSMA. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и PSMA. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и IL1RAP. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD33. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и IL1RAP. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и CD33. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и TMEFF2. Изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и TMEFF2. Изобретение относится к фрагментам антител, полинуклеотидам, кодирующим антитела или их фрагменты, и способам их получения и применения.

**045935 B1****045935 B1**

### Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 3 мая 2019 г., называется JBI5135WOPCT1\_Sequence\_listing.txt и имеет размер 588 килобайт.

#### Область техники

Изобретение, предложенное в настоящем документе, относится к антителам к кластеру дифференцировки 3 (CD3) и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим CD3, и в частности к антителам к CD3 и антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно реагируют с CD3 отличного от человека млекопитающего (например, яванского макака); антителам к простатспецифическому мембранному антигену (PSMA) и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим PSMA; антителам к IL1RAP и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим IL1RAP; антителам к CD33 и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим CD33; и биспецифическим антителам, способным специфически связывать CD3; PSMA; IL1RAP; CD33; CD3 и PSMA; CD3 и IL1RAP; или CD3 и CD33. Данное изобретение также относится к применению таких антител и антигенсвязывающих фрагментов при лечении злокачественного новообразования, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других патологических состояний.

#### Предпосылки

Биспецифические антитела и фрагменты антител исследовали как средство для рекрутинга цитолитических Т-клеток для уничтожения опухолевых клеток. Однако клиническое применение многих биспецифических антител, рекрутирующих Т-клетки, ограничено проблемами, включая неблагоприятную фармакокинетику, потенциальную иммуногенность и проблемы при производстве. Таким образом, существует значительная потребность в биспецифических антителах, рекрутирующих цитолитические Т-клетки, для уничтожения опухолевых клеток, демонстрирующих сниженную токсичность и благоприятные производственные профили.

Белковый комплекс Т-клеточный антигенный рецептор/CD3 человека состоит из шести различных цепей: CD3 $\gamma$ -цепи (SwissProt P09693), CD3 $\delta$ -цепи (SwissProt P04234), двух CD3 $\epsilon$ -цепей (SwissProt P07766) и одного гомодимера CD3 $\zeta$ -цепи (SwissProt P20963) ( $\epsilon$   $\gamma$ :  $\epsilon$   $\delta$ :  $\zeta$  $\zeta$ , который связан с  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями Т-клеточного рецептора. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. CD3 необходим для иммунного ответа.

#### Сводная информация

В настоящем документе предложены выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690; переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661; тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 676; или содержащие: тяжелую цепь, содержащую HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 773, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690; переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 678.

Также предложены выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты имеют одно, два, три или четыре из следующих свойств:

связывают CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывают клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

связывают рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691) или связывают рекомбинантный

CD3ε от человека (SEQ ID NO: 636), или рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692) с равновесной константой диссоциации (KD) 12 нМ или менее, причем KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

связывают остатки 1-6 CD3ε при определении с помощью рентгенокристаллографии; или активируют Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; или HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 673, 673 и 690 соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно или HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

Дополнительно в настоящем документе описаны биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно; и второй домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 697, 683, 698, 699, 792 и 686 соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и второй домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 681 и 682 соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно; и второй домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 679 и 680 соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно; и второй домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 704, 705, 706, 707, 708 и 709 соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и второй домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 702 и 703 соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно; и второй домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 700 и 701 соответственно.

В изобретении дополнительно предложены выделенные биспецифические антитела к CD3×PSMA, содержащие первый домен, который связывается с клетками, экспрессирующими рекомбинантный белок CD3d, или CD3ε *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью 300 нМ или менее, причем связывание с клетками измеряют методом проточной цитометрии, и второй домен, который специфически связывается с PSMA.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CD3×PSMA содержит первый домен, который

связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3ε от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3ε от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (KD) 12 нМ или менее, в котором KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

демонстрирует отсутствие окисления метионина или триптофана, или отсутствие деамидирования аспарагина, или демонстрирует отсутствие изомеризации аспарагина по результатам анализа методом пептидного картирования;

связывает остатки 1-6 CD3ε при определении с помощью рентгенокристаллографии; или активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

Также описаны фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении дополнительно предложены способы получения антител, описанных в настоящем документе, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином. Способы получения биспецифического антитела к CD3×PSMA могут включать объединение моноспецифического двухвалентного антитела к CD3, имеющего две идентичные HC1 и две идентичные LC1, и моноспецифического двухвалентного антитела к PSMA, имеющего две идентичные HC2 и две идентичные LC2, в смеси с молярным соотношением приблизительно 1:1; введение в смесь восстанавливающего агента; инкубирование смеси в течение от приблизительно 90 мин до приблизительно 6 ч; удаление восстанавливающего агента; и очистку биспецифического антитела к CD3×PSMA, которое содержит HC1, LC1, HC2 и LC2.

Дополнительно описаны способы лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества описанных выделенных антител субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

В изобретении также предложены наборы, содержащие антитела, описанные в настоящем документе. Наборы могут дополнительно содержать реагенты для обнаружения антител и инструкции по применению.

### **Краткое описание графических материалов**

Изложение сущности изобретения, а также последующее подробное описание будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми рисунками. С целью иллюстрации описанных антител и способов в графических материалах представлены примеры осуществления антител и способов; однако антитела и способы не ограничиваются конкретными раскрытыми вариантами осуществления. В графических материалах показано следующее:

На фиг. 1A и 1B показаны антитела к CD3, продуцируемые OmniRat. Последовательности VH (фиг. 1A) и VL (фиг. 1B) активных мкАт к CD3, продуцируемых у OmniRat, были выровнены с последовательностями человеческой зародышевой линии из IMGT. CDR подчеркнуты. Дивергенция последовательностей показана жирным шрифтом. На фиг. 1A описаны SEQ ID NO: 651, 653, 656, 655, 20, 654 и 717, а на фиг. 1B описаны SEQ ID NO: 658, 688, 660, 659 и 718 соответственно, все из которых представлены в порядке появления.

На фиг. 2 показан клеточный анализ связывания для оценки связывающей способности отдельных супернатантов гибридом крыс с человеческими очищенными CD3+ Т-лимфоцитами.

На фиг. 3 показан клеточный анализ связывания для оценки связывающей способности отдельных супернатантов гибридом крыс с очищенными CD3+ Т-лимфоцитами яванского макака.

На фиг. 4 показаны результаты конкурентного анализа для супернатантов гибридом, оцениваемые на их способность конкурировать с коммерческим антителом к CD3 человека SP34-2, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака.

На фиг. 5 показаны репрезентативные кривые связывания антител к CD3 на первичных Т-клетках человека.

На фиг. 6 показаны репрезентативные кривые конкурентного связывания антител к CD3 с конъюгированным AlexaFluor 488 SP34-2 на первичных Т-клетках человека.

На фиг. 7 показано связывание мкАт BLW-2E6 со сконструированной легкой цепью (LC) с первичными Т-клетками человека.

На фиг. 8 показано связывание BLW-2E6 со сконструированной тяжелой цепью (HC) с первичными Т-клетками человека.

На фиг. 9 показано насыщение CD3 человека красителем AlexaFluor™ (AF) 488 посредством анализа методом FACS. Полученные средние значения интенсивности флуоресценции строили на графике в виде зависимости от концентрации молекулы антитела. Для каждого донора получали значения Kd и получали среднее значение. Константа насыщения связывания (KdT) для человеческих Т-клеток составила  $5,6 \pm 1,0$  нМ (n=4) и была использована в настоящем документе для определения аффинности связывания Kd. Один донор-человек был исключен, поскольку во время анализа он не соответствовал критериям жизнеспособности, составляющим по меньшей мере 60%. Идентификаторы LS на фигурах условных обозначений относятся к отдельным донорам человеческих Т-клеток.

На фиг. 10 показаны кривые ингибирования для двухвалентных антител к CD3, CD3B376 и CD3B450, для конкуренции за связывание с антителом AlexaFluor488 SP-34 к CD3. Значения IC50 составили 29 и 60 нМ соответственно.

На фиг. 11 показаны сенсограммы связывания вариантов BLW-2E6 с hCD3s(1-27)-Tn25.

На фиг. 12A-12E показана термостабильность антител к CD3 CD3B376 (фиг. 12A), CD3B450 (фиг. 12B), CD3B389 (фиг. 12C), CD3B467 посредством DSC (фиг. 12D) и наложение термограмм для

всех кандидатов (фиг. 12E).

На фиг. 13A, 13B показаны сравнения термостабильности антител к CD3 с наложением термограмм для CD3B376 и CD3B389 (фиг. 13A); наложением термограмм для CD3B450 и CD3B467 (фиг. 13B).

На фиг. 14 показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 15 показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 16 показаны результаты по PSMA-отрицательному связыванию с клетками PC3 биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью.

На фиг. 17 показаны результаты биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью в функциональном анализе уничтожения клеток.

На фиг. 18 показаны взаимодействия антитело-антиген в комплексе CD3B334:CD3. Остатки CD3 находятся в эллипсах, остатки CD3B334 находятся в прямоугольниках.

На фиг. 19 показан анализ на основе первичных Т-клеток человека и яванского макака, используемый для определения способности отобранных соединений из гибридом активировать Т-клетки, измеренной по активации CD69.

На фиг. 20 показана противоопухолевая эффективность PS3B79 в ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли как средний объем опухоли, выраженный в  $\text{мм}^3 \pm \text{СОС}$  (\*  $p < 0,0001$ ).

На фиг. 21 показана противоопухолевая эффективность PS3B90 в модели ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в  $\text{мм}^3 \pm \text{СОС}$  (\*  $p < 0,001$ ).

На фиг. 22A-22D показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA с клетками LNCaP человека. На фиг. 22A показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59. На фиг. 22B показаны M52 и M110. На фиг. 22C показаны M85, M87 и M81. На фиг. 22D показаны M52 и M84. На фиг. 22D экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCAP человека, PSMG5 (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На фиг. 23A-23D показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA шимпанзе. (Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и НЕК, экспрессирующих PSMA шимпанзе.) На фиг. 23A показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59. На фиг. 23B показаны M52 и M110. На фиг. 23C показаны M81, M52, M85, и M87. На фиг. 23D показаны M52 и M84. На фиг. 23D экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCAP человека, PSMG5 (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На фиг. 24A-24D показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA яванского макака. (Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA по сравнению с НЕК, экспрессирующими PSMA яванского макака.) На фиг. 24A показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59. На фиг. 24B показаны M52 и M110. На фиг. 24C показаны M81, M52, M85 и M87. На фиг. 24D показаны M52 и M84. На фиг. 24D экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCAP человека, PSMGS (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На фиг. 25 показана общая структура Fab PSMM84, связанного с гомодимером ВКД человеческого PSMA.

На фиг. 26 показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с легкой цепью PSMB83.

На фиг. 27 показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с тяжелой цепью PSMB83.

На фиг. 28 показано сравнение остатков эпитопа PSMB83 в последовательностях PSMA человека (SEQ ID NO: 719), мыши (SEQ ID NO: 720) и яванского макака (макаки) (SEQ ID NO: 721). Остатки

эпитопа заштрихованы, а дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

На фиг. 29 показаны остатки паратопа PSMB83. CDR подчеркнуты, а остатки паратопа заштрихованы. На фиг. 29 раскрыты SEQ ID NO: 722-727 соответственно по порядку.

На фиг. 30 представлена карта взаимодействия с прямыми контактами, установленными между PSMA и PSMM84. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия показаны пунктирными линиями, а водородные связи представлены сплошными линиями со стрелками, указывающими на атомы остова.

На фиг. 31 показаны уровни экспрессии клонов Fab к PSMA, полученных из PSMM84, по сравнению с экспрессией исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 32 показано связывание с человеческим PSMA клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMM84. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 33 показано связывание с PSMA яванского макака клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMM84. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На фиг. 34 показана цитотоксичность Т-клеток, опосредованная IC3B19 и IC3B34, ex vivo для клеток LAMA-84 20 в цельной крови через 48 ч. Концентрация IC3B19 и IC3B34 приведена в таблице в нижней части фигуры.

На фиг. 35 показана активация Т-клеток, опосредованная IC3B19 и IC3B34, ex vivo в цельной крови через 48 ч. Концентрация IC3B19 и IC3B34 приведена в таблице в нижней части фигуры.

На фиг. 36-55 показано опосредованное IC3B19 и IC3B34 вовлечение Т-клеток и IL1RAP+ линии клеток-мишеней LAMA-84 (эндогенные и добавленные экзогенно опухолевые клетки). Супернатанты оценивали в отношении 10 провоспалительных цитокинов из цельной крови (n=15 доноров) и анализировали активацию Т-клеток с добавлением экзогенной линии IL1RAP+ опухолевых клеток LAMA-84. Для этих фигур статистически значимые различия показаны жирным шрифтом.

На фиг. 36А, 36В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-бета, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 36А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 36В) через 24 ч.

На фиг. 37А, 37В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-бета, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 37А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 37В) через 48 ч.

На фиг. 38А, 38В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-2, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 38А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 38В) через 24 ч.

На фиг. 39А, 39В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-2, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 39А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 39В) через 48 ч.

На фиг. 40А, 40В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-4, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 40А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 40В) через 24 ч.

На фиг. 41 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-4, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 ч.

На фиг. 42А, 42В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-6, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 42А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 42В) через 24 ч.

На фиг. 43 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-6, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 ч.

На фиг. 44 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-8, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 24 ч.

На фиг. 45 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-8, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 ч.

На фиг. 46А, 46В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-10, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 46А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 46В) через 24 ч.

На фиг. 47А, 47В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-10, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 47А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 47В) через 48 ч.

На фиг. 48 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-12p70, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 24 ч.

На фиг. 49 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-12p70, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 ч.

На фиг. 50 показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-13, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через

24 ч.

На фиг. 51А, 51В показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-13, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 51А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 51В) через 48 ч.

На фиг. 52А, 52В показано высвобождение Т-клеточного ИФН-гамма, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 52А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 52В) через 24 ч.

На фиг. 53А, 53В показано высвобождение Т-клеточного ИФН-гамма, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 53А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 53В) через 48 ч.

На фиг. 54А, 54В показано высвобождение Т-клеточного ФНО-альфа, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 54А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 54В) через 24 ч.

На фиг. 55А, 55В показано высвобождение Т-клеточного ФНО-альфа, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (фиг. 55А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (фиг. 55В) через 48 ч.

На фиг. 56 показаны IC3B19 и IC3B34, но не биспецифические антитела с нулевыми плечами (IAPB57×B23B49 или B23B39×CD3B219), индуцированные специфической к мишени цитотоксичностью в клетках NCI-H1975. В этом анализе EC50 цитотоксичности варьируется в пределах трех раз для IC3B19 и IC3B34, при этом значения составляют 0,018 и 0,057 нМ соответственно.

На фиг. 57 показана противоопухолевая эффективность IAPB57×CD3B376 в ксенотрансплантатах человеческих клеток NSCLC H1975 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли H1975 измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм<sup>3</sup>±СОС, \* p<0,0001.

На фиг. 58 показано сравнение изоэлектрических точек для различных конструкторов к PSMA.

На фиг. 59 показано изменение длины волны по сравнению с контрольной молекулой CNT05825. Контрольное CNT0607 демонстрирует характерное сильное самовзаимодействие. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения от среднего значения трех повторностей.

На фиг. 60 показано сравнение времени удерживания на IgG и контрольных колонках в анализе перекрестного взаимодействия с антителом к PSMA.

На фиг. 61А, 61В показана оценка *ex vivo* биспецифических антител к CD33×CD3 с цитотоксичностью плеча к CD3 CD3B219 и CD3B376 в отношении бластов и активации Т-клеток в свежей цельной крови пациента с ОМЛ. На фиг. 61А показан процент общей цитотоксичности в отношении клеток ОМЛ с использованием биспецифических антител к CD33 или контролей к CD3×null. На фиг. 61В показана активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами к CD33 или контролями к CD3×null. При этом не было добавлено ни одного блокатора Fc.

На фиг. 62А-62С показаны анализы опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности. Биспецифические антитела к CD33×CD3 с использованием плеча к CD3 CD3B219 и анти-CD3B376 инкубировали с человеческими пан Т-клетками и линиями клеток ОМЛ, которые были или дикого типа (KG1, фиг. 62А), или гетерозиготными (SH2, фиг. 62В), или гомозиготными (OCIAML3, фиг. 62С) по SNP-мутации CD33 rs12459419, через 48 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> общую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток измеряли с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 63А, 63В показана оценка *ex vivo* антител С33В904 в комбинации с CD3B219 или CD3B376 на цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13, экзогенно добавленных к нормальной здоровой цельной крови человека (N=6 доноров): Процент цитотоксичности в отношении клеток MOLM-13 (фиг. 63А) и CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> моноцитов (фиг. 63В) с использованием биспецифических антител к CD33×CD3 и соответствующих контролей к null×CD3 через 48 ч.

На фиг. 64А, 64В показана оценка *ex vivo* биспецифических антител к CD33×CD3 с применением плеча к CD3 CD3B219 и CD3B376 на цитотоксичность в отношении моноцитов и активацию Т-клеток в свежей цельной крови от шести нормальных доноров яванского макака. На фиг. 64А показан процент общей клеточной цитотоксичности в отношении CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> моноцитов яванского макака при использовании биспецифических антител к CD33 или их контролей к CD3×null. На фиг. 64В показана активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами к CD33 или их контролями к CD3×null. При этом не было добавлено ни одного блокатора Fc.

На фиг. 65 показана противоопухолевая эффективность С3СВ189 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали на биолюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения (ф/с/см<sup>2</sup>/ср)±СОС (n=8-10/группа). \* p<0,0001 для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

На фиг. 66 показана выживаемость животных, получавших в качестве лечения С3СВ189, в модели

ксенотрансплантатов человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Выживаемость мышей, несущих MOLM-13, графически представлена с использованием кривой Каплана-Мейера и оценивается с помощью логрангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). \*  $p < 0,0001$  для групп лечения в сравнении с контрольными группами.

На фиг. 67 показана противоопухолевая эффективность СЗСВ88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали на биолюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения ( $\text{ф/с/см}^2/\text{ср}$ )  $\pm$  СОС ( $n=8-10/\text{группа}$ ). \*  $p < 0,0001$  для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

На фиг. 68 показана выживаемость животных, получавших в качестве лечения СЗСВ88, в модели ксенотрансплантатов человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Выживаемость мышей, несущих MOLM-13, графически представлена с использованием кривой Каплана - Мейера и оценивается с помощью логрангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). \*  $p < 0,05$  для групп лечения в сравнении с контрольными группами.

На фиг. 69 показано выравнивание выбранных вариабельных областей тяжелой цепи (VH) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На фиг. 70 показано выравнивание выбранных вариабельных областей легкой цепи (VL) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На фиг. 71 показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB132, в модели рака предстательной железы LnCaP ex vivo у самцов мышей NSG.

На фиг. 72 показана эффективность TMEB762 $\times$ CD3B376 в развившихся ксенотрансплантатах LNCaP у гуманизированных Т-клетками мышей NSG.

На фиг. 73 показана активация Т-клеток в клетка рака предстательной железы LnCaP в ответ на введение TMCB132.

На фиг. 74 показана опосредованная Т-клетками цитотоксичность TMCB132.

На фиг. 75 показана противоопухолевая эффективность TMCB132 у гуманизированных Т-клетками мышей.

### Подробное описание изобретения

Все публикации, включая без ограничений патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

Термины "специфическое связывание", или "специфически связывает", или "связывает" относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, например, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, с  $K_D$ , которая по меньшей мере в сто раз ниже его  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерять с помощью стандартных процедур. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, в отношении такого же антигена от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

"Антитела" означает в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, включая мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы



иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. "Полноразмерные молекулы антител" состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно поделить на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

"Определяющие комплементарность области (CDR)" представляют собой области антитела, которые связывают антиген. CDR можно определить с помощью различных систем разграничения, например, таких как Kabat (Wu et al. (1970), J. Exp. Med., 132:211-50; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987), J. Mol. Biol., 196:901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003), Dev. Comp. Immunol., 27:55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996), J. Biomol. Biol., 263:800-15). Описано соответствие между различными системами разграничения и нумерациями варибельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003), Dev. Comp. Immunol., 27:55-77; Honegger and Pluckthun (2001), J. Mol. Biol., 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, [http://www\\_imgt\\_org](http://www_imgt_org)). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" и "LCDR3" включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают в себя VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, варибельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструкторами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т.е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, а также моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

"Выделенное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, который по существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, специфически связывающее антиген, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от указанного антигена). В случае биспецифических антител к CD3 биспецифическое антитело специфически связывает как CD3, так и второй антиген. Термин "выделенное антитело" охватывает антитела, выделенные так, что они имеют более высокую степень чистоты, такие как антитела, являющиеся чистыми на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Термин "гуманизованное антитело" относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из

последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин "человеческое антитело" относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Варибельные области человеческого антитела получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело человека содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов человека. Антитело человека содержит варибельные области тяжелой и легкой цепи, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если варибельные области антитела человека получены из системы, в которой используется иммуноглобулин человеческой зародышевой линии или реаранжированные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы иммуноглобулинов человека. "Антитело человека", как правило, содержит аминокислотные различия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у человека, из-за различий между системами, используемыми для получения антитела человека и локусов иммуноглобулина человека, введения соматических мутаций или преднамеренного введения замен в каркасные области или CDR, или и то и другое. Как правило, "антитело человека" на по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях "антитело человека" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Кпаррик et al. (2000), *J. Mol. Biol.*, 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al. (2010), *J. Mol. Biol.*, 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO 2009/085462.

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей данного изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей генерируются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для выравнивания последовательностей ALIGN-2 была автоматизирована Genentech, Inc., а исходная программа была подана вместе с документацией пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где она зарегистрирована под номером регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN 2 находится в свободном доступе от Genentech, Inc., г. Южный Сан-Франциско, штат Калифорния, США, или ее можно скомпилировать из исходного кода. Для применения в операционной системе UNIX, включающей цифровую версию UNIX V4.0D, программу ALIGN-2 нужно скомпилировать. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и остаются неизменными. Если для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности данной аминокислотной последовательности А к, с, или по отношению к данной аминокислотной последовательности В (что в альтернативном варианте может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

$$100 \text{ умножить на соотношение } X/Y,$$

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при программном выравнивании А и В, и Y представляет общее количество аминокислотных остатков в В.

Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности А не равняется длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А. Если специально не указано

иное, все значения % идентичности аминокислотных последовательностей, которые используются в данном документе, получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин "рекомбинантный" относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывает антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. "Эпитоп" антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами антитела, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейных последовательностей аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи", или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означают остатки легкой и тяжелой цепей антитела, контактирующие, соответственно, с антигеном или в целом "остатки паратопа антитела" означают те аминокислоты антитела, которые контактируют с антигеном.

Термин "биспецифический" относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Mascaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин "мультиспецифический" относится к антителу, которое специфически связывает два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Mascaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Термин "вектор" относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Векторные полинуклеотиды, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, промотор, сигнал полиаденилирования и селективные маркеры, способствующие дубликации или сохранению данных полинуклеотидов в биологической системе, такой как клетка, вирус, животное, растение и восстановленные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Векторный полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или их гибрид, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу.

Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечная и одноцепочечная ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов. Термин "полинуклеотид" может относиться к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру, к ДНК является примером синтетического полинуклеотида.

Термин "полипептид" или "белок" относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

"Проточная цитометрия" представляет собой технологию, применяемую для определения физических и химических характеристик частиц в текучей среде по мере их прохождения через по меньшей мере один лазер. Компоненты клеток флуоресцентно метят, а затем возбуждают лазером для излучения света с различными длинами волн (Adan et al., *Critical Reviews in Biotechnology* (2016), 1549-7801).

"Антиидиотипическое (анти-Id) антитело" представляет собой антитело, которое распознает антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Специалистам в данной области техники по существу известен способ получения или приготовления антиидиотипического антитела. (Lathey, J. et al., *Immunology*, 1986, 57(1):29-35). Антиидиотипическое антитело может быть антиген-блокирующим или неблокирующим. Антиген-блокирующие антиидиотипическое антитела можно использовать для обнаружения свободных антител в образце, например, CD3. Неблокирующее антиидиотипическое антитело можно использовать для обнаружения общего антитела (свободного, частично связанного с антигеном или полностью связанного с антигеном) в образце. Антиидиотипическое антитело можно получить путем иммунизации животного антителом, к которому получают антиидиотипическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антиидиотипическое антитело используется для обнаружения уровня терапевтических антител в образце.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Антитело к антиидиотипическому антителу может быть идентично по эпитопам первичному мкАт, которое индуцировало образование антиидиотипического антитела. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или получать производные с помощью любого подходящего способа, такого как те, которые описаны в другом месте в настоящем документе в отношении антител к CD3.

PSMA относится к простатспецифическому мембранному антигену. Аминокислотная последовательность PSMA Pan troglodytes (также называемых шимпанзе) показана в SEQ ID NO: 49. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 49. Аминокислотная последовательность PSMA Macaca fascicularis (также называемого яванским макаком, макаком или макаком-крабоедом) показана в SEQ ID NO: 50. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 50. Аминокислотная последовательность зрелого PSMA человека приведена в SEQ ID NO: 51. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 51.

В настоящем описании термины "CD3-специфический" или "специфически связывает CD3" или "антитело к CD3" относятся к антителам, которые специфически связываются с полипептидом CD3-эпсилон (SEQ ID NO: 635), включая антитела, которые специфически связываются с внеклеточным доменом CD3-эпсилон (ВКД) (SEQ ID NO: 636). CD3-эпсилон, вместе с CD3-гамма, -дельта и -дзета, а также гетеродимерами Т-клеточных рецепторов альфа/бета и гамма/дельта, образуют комплекс Т-клеточный рецептор - CD3. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. Для иммунного ответа необходим CD3.

SEQ ID NO: 635 (человеческий CD3-эпсилон).

MQSGTHWRVGLGLCLLSVGVWQDGNEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGS  
EILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR  
ARVCENCMEMDVMSVATIVVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR  
GQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRI

SEQ ID NO: 636 (внеклеточный домен человеческого CD3-эпсилон).

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS  
DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

Используемые в настоящем документе термины "акцессорный белок рецептора интерлейкина-1", "IL1RAP" и "IL1-RAP" конкретно включают человеческий белок IL1RAP, например, как описывается в каталоге Genbank под номером доступа AAB84059, эталонная последовательность NCBI: NP\_002173.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9NPH3-1 (см. также Huang et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94 (24), 12829-12832). В научной литературе IL1RAP также известен как IL1 R3, C3orf13, FLJ37788, IL-1 RAcP и EG3556.

Термин "CD33" относится к белку кластера дифференцировки 33. CD33 представляет собой

однопроходной трансмембранный гликопротеин размером 67 килодальтон (кДа) и является членом семейства связывающих сиаловую кислоту иммуноглобулиноподобных лектинов (Siglecs). CD33 в основном считается антигеном миелоидной дифференцировки, имеющим низкий уровень экспрессии в миелоидных клетках-предшественниках, нейтрофилах и макрофагах и высокий уровень экспрессии в циркулирующих моноцитах и дендритных клетках. Внеклеточный домен CD33 человека (Uniprot P20138) (SEQ ID NO: 636) и CD33 яванского макака (XP005590138.1) являются примерами белков для применения в получении CD33-специфических антител по настоящему описанию.

Термин "TMEFF2" относится к человеческому трансмембранному белку с EGF-подобным и двумя фоллистатиноподобными доменами 2, также называемым томорегулином 2. Аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности TMEFF2 человека приведена в SEQ ID NO: 77. Внеклеточный домен TMEFF2 приведен в SEQ ID NO: 575 и охватывает остатки 40-374 полноразмерного TMEFF2. Внеклеточный домен TMEFF2 содержит три отдельных субдомена: Kazal-подобный 1 (остатки 85-137), Kazal-подобный 2 (остатки 176-229) и EGF-домен (остатки 261-301). EGF-домен TMEFF2 приведен в SEQ ID NO: 577. Термин "мембранная проксимальная область" TMEFF2 относится к области TMEFF2 с SEQ ID NO: 629, которая охватывает EGF-домен и N-С-концевые линкерные области (например, остатки 230-320 полноразмерного человеческого TMEFF2 с SEQ ID NO: 77). Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к отличным от человека видам. Таким образом, "TMEFF2" означает человеческий TMEFF2, если не указано что он получен от видов, отличных от человека, например, "мышинный TMEFF2" или "обезьяний TMEFF2" и т.д.

SEQ ID NO: 77 (полноразмерный человеческий TMEFF2).

```
MVLWESPRQCSSWTLCEGFCWLLLLPVMILLIVARPVKLAAPFPTSLSDCQTPTGW
NCSGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGCELRIGDVTVCVCQFKCNNDYVPCVGSNGESYQN
ECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSGETSQKETSTCDICQFGAEC
DEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRCQD
NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPS
CRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVPVPGVRFQYVLIAAVIGTIQIAVICVVVLCITRKCPRS
NRIHRQKQNTGHYSSDNTTRASTRLI
```

SEQ ID NO: 575 (внеклеточный домен человеческого TMEFF2).

```
FPTSLSDCQTPTGWNCSGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGCELRIGDVTVCVCQFK
CNNDYVPCVGSNGESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSG
ETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEA
SCQKQEKIEVMSLGRCQDNTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYN
GFCMHGKCEHSINMQEPSRCRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVPVPGVRFQYVLIAAVIGTI
QIAVICVVVLCITRKCPRSRIHRQKQNTGHYSSDNTTRASTRLI
```

EGF-домен TMEFF2, SEQ ID NO: 577.

```
HNIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSRCRCDAGYTGQHCE
```

Мембранная проксимальная область TMEFF2, SEQ ID NO: 629.

```
NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSIN
MQEPSRCRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVPVPGVRFQYV
```

Термин " TMEFF2-положительное злокачественное новообразование" относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеримый уровень белка TMEFF2. Уровень белка TMEFF2 может быть измерен с использованием хорошо известных анализов с использованием, например, твердофазного ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммуноанализа на живых или лизированных клеток. Термины "сверхэкспрессия", "сверхэкспрессированный" и "сверхэкспрессирующий" взаимозаменяемо относятся к образцу, такому как раковая клетка, злокачественная клетка или раковая ткань, которые имеют значительно более высокие уровни опухолевого антигена по сравнению с эталонным образцом. Сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию белка в образце можно измерять с помощью известных анализов, например, твердофазного ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммунного анализа на живых или лизированных клетках. Экспрессию и сверхэкспрессию полинуклеотида в образце можно измерять, например, с помощью методик флуоресцентной гибридизации in situ, саузерн-блоттинга или ПЦР. Белок или полинуклеотид сверхэкспрессируется, когда уровень белка или полинуклеотида в образце в по меньшей мере 1,5 раза выше по сравнению с эталонным образцом. Выбор эталонного образца хорошо известен.

Термин "образец" относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из

организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами образцов являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитные жидкости, такие как связанные с несоллидными опухолями, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например, среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т.п., биоптаты тканей, аспираты, взятый тонкой иглой, или ткань опухоли после хирургической резекции.

Термин "раковая клетка" или "опухолевая клетка" относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя преобразование может вызвать инфицирование преобразующим вирусом и встраивание новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощение экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/злокачественное новообразование проявляется в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркера, специфических для опухоли, инвазивности, росте опухоли у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1 до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Термин "эффektorные антигены" представляют собой антигены из клеток иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена и/или высвобождение цитокинов. Такие эффektorные антигены получены, например, без ограничений из Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK). Примеры подходящих специфичностей для эффektorных антигенов включают без ограничений CD3 или субъединицы CD3, такие как CD3 $\epsilon$  для Т-клеток и CD16 для NK-клеток. Такие молекулы клеточной поверхности эффektorных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток. Эффektorные клетки представляют собой клетки иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена и/или высвобождение цитокинов. Такие эффektorные клетки представляют собой, например, без ограничений, Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), гранулоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и антигенпрезентирующие клетки. Примеры подходящей специфичности для эффektorных клеток включают без ограничений CD2, CD3 и субъединицы CD3, такие как CD3 $\epsilon$ , CD5, CD28 и другие компоненты Т-клеточного рецептора (TCR) для Т-клеток; CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C и NKG2D, DNAM, NCR для NK-клеток; CD18, CD64 и CD89 для гранулоцитов; CD18, CD32, CD64, CD89 и маннозный рецептор для моноцитов и макрофагов; CD64 и маннозный рецептор для дендритных клеток; а также CD35. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти специфичности, т.е. молекулы клеточной поверхности, эффektorных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток при связывании биспецифических или мультиспецифических молекул с такой молекулой клеточной поверхности и, таким образом, индуцируя цитолиз или апоптоз.

Термин "биспецифическое антитело к CD3" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий второй антиген, например, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. Домены, специфически связывающие CD3 и второй антиген, как правило, представляют собой пары  $V_H/V_L$ . Биспецифическое антитело к CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с CD3, или со вторым антигеном. В некоторых вариантах осуществления второй или целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффektorной клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген (ТАА). Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, IL1RAP и TMEFF2.

Термины "биспецифическое антитело к PSMA $\times$ CD3", "антитело к PSMA/CD3", "биспецифическое

антитело против PSMA×CD3" или "антитело против PSMA/CD3" и т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий PSMA, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие PSMA и CD3, как правило, представляют собой пары  $V_H/V_L$ . Биспецифическое антитело к PSMA×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с PSMA, или с CD3.

Термины "биспецифическое антитело к CD33×CD3", "антитело к CD33/CD3", "биспецифическое антитело против CD33×CD3" или "антитело против CD33/CD3" и т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD33, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие CD33 и CD3, как правило, представляют собой пары  $V_H/V_L$ . Биспецифическое антитело к CD33×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с CD33, или с CD3.

Термины "биспецифическое антитело к IL1RAP×CD3", "антитело к IL1RAP/CD3", "биспецифическое антитело против IL1RAP×CD3" или "антитело против IL1RAP/CD3" и т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий IL1RAP, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие IL1RAP и CD3, как правило, представляют собой пары  $V_H/V_L$ . Биспецифическое антитело к IL1RAP×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с IL1RAP, или с CD3.

Термины "биспецифическое антитело против TMEFF2/CD3", "антитело к TMEFF2/CD3", "антитело к TMEFF2×CD3" и т.п. относятся к антителу, которое связывается с TMEFF2 и CD3.

Термин "валентный" относится к наличию в молекуле установленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины "моновалентный", "двухвалентный", "четырёхвалентный" и "шестивалентный" относятся к наличию в молекуле одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена. Термин "мультивалентный" относится к наличию двух или более сайтов связывания, специфических для антигена в молекуле.

Термин "антигенспецифическая CD4+ или CD8+ Т-клетка" относится к CD4+ или CD8+ Т-клетке, активированной специфическим антигеном или его иммуностимулирующим эпитопом.

Термин "пациент" включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин "отличное от человека животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и отличных от млекопитающих животных, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д. Если не указано иное, термины "пациент" или "субъект" применяются взаимозаменяемо.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с индексом EU, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), если явно не указано иное.

В настоящем изобретении применяются стандартные одно- и трехбуквенные коды аминокислот.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамин	Glu	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Химические соединения.

В настоящем изобретении предложены антитела к CD3 и их антигенсвязывающие фрагменты, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PSMA, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CD33, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают IL1RAP, мультиспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, а также мультиспецифические антитела, которые специфически связывают CD3, и один или более из PSMA, CD33, IL1RAP и TMEFF2. В настоящем изобретении предложены полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие биспецифические антитела по изобретению, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Общие аспекты антител, описанных в настоящем документе.

Описанные в настоящем документе антитела к CD3 или антигенсвязывающие фрагменты включают варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен, делеций или добавления, которые сохраняют биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных антител к CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие обозначения:

i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409\*. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя (a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами; (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него; (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель; и (d) варианты, в которых полипептид сливаются с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах



осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к изотипу IgM, IgD, IgG, IgA или IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG3. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. Соответственно такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотных последовательностях в областях CH1, CH2 и CH3, но демонстрируют значительные различия в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Fc-область опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). При АЗКЦ Fc-область связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности иммунных эффекторных клеток, например, естественных клеток-киллеров и макрофагов, что приводит к лизису клеток-мишеней. При КЗЦ антитела опосредуют целевое уничтожение клеток, запуская каскад комплемента на поверхности клетки. При АЗКФ антитело опосредует уничтожение покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. Описанные в данном документе антитела включают антитела с описанными свойствами переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых Fc-область была модифицирована для модуляции различных эффекторных функций.

Для многих применений терапевтических антител эффекторные функции, опосредованные Fc, нежелательны, поскольку они потенциально могут представлять риск безопасности из-за истощения популяции клеток. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования Fc-областей для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) FcγR или первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, расположенных в шарнирной области и в домене CH2. Мутации могут быть введены в IgG1, IgG2 и IgG4 для снижения или подавления опосредованных Fc эффекторных функций. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP содержат сконструированную Fc-область, имеющую одно или более из следующих свойств: (а) сниженная эффекторная функция по сравнению с исходной Fc; (б) сниженная аффинность к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa; (с) сниженная аффинность к FcγRI; (д) сниженная аффинность к FcγRIIa; (е) сниженная аффинность к FcγRIIIb; или (ф) сниженная аффинность к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP относятся к изотипам, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, F234A и L235A в своей Fc-области по сравнению с IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замены L234A, и L235A в Fc-области. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляет собой изотип IgG4, необязательно имеющий замену в тяжелой цепи S228P.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляют собой изотип IgG1, необязательно имеющий замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляют собой изотип IgG2, необязательно имеющий замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа.

IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV  
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 602)

IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 601)

IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVKCCVECPCPAPPV  
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTFRVVS SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP  
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 711)

В определенных вариантах осуществления предложены меченые антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP. Иллюстративные метки или фрагменты, которые обнаруживаются напрямую (например, флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), и метки и фрагменты (например, ферменты или лиганды), которые обнаруживаются опосредованно (например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия). Примеры радиоактивных меток включают радиоактивные метки (например, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>111</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, I), флуоресцентные метки (такие как DyLight® 649), эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, электрохемилюминесцентные метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, <sup>111</sup>In-DOTA, <sup>111</sup>In-диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТПА), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т.п.

В дополнение к описанным антителам к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP и антигенсвязывающим фрагментам также предложены полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E.coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридными клетками.

Создание моноспецифических антител

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению являются гуманизированными.

Описанные в настоящем документе моноспецифические антитела по изобретению (например, антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP ) можно получать с использованием различных технологий. Например, для получения моноклональных антител можно использовать метод гибридом Kohler and Milstein, Nature, 256:495, 1975. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяин, такое как хомяк, крыса или курица, иммунизируют PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3 человека, шимпанзе или макака или фрагментами PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3, такими как внеклеточный домен PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3, с последующим слиянием клеток селезенки от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных методов для получения клеток гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-103

(Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, подвергают скринингу на основании продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Различные животные-хозяева могут быть использованы для продуцирования антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению, описанных в настоящем документе. Например, для получения мышинных антител к человеческому PSMA можно использовать мышей Balb/c. Антитела, полученные от мышей линии Balb/c

и от других животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы с применением разнообразных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями.

Примеры методик гуманизации, включающих отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают в себя пересадку CDR (патент США № 5225539), пересадку SDR (патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan (1991), *Mol. Immunol.*, 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8748356) или супергуманизацию (патент США № 7709226). В этих способах CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO 1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения человеческих антител против белка-мишени можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши или крысы, которые описаны, например, в патенте США № 6150584, международной патентной публикации № WO 99/45962, международных патентных публикациях № WO 2002/066630, WO 2002/43478, WO 2002/043478 и WO 1990/04036; Lonberg et al. (1994), *Nature*, 368:856-9; Green et al. (1994), *Nature Genet.*, 7:13-21; Green & Jakobovits (1998), *Exp. Med.*, 188:483-95; Lonberg and Huszar (1995), *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93; Bruggemann et al. (1991), *Eur. J. Immunol.*, 21:1323-1326; Fishwild et al. (1996), *Nat. Biotechnol.*, 14:845-851; Mendez et al. (1997), *Nat. Genet.*, 15:146-156; Green (1999), *J. Immunol. Methods*, 231:11-23; Yang et al. (1999), *Cancer Res.*, 59:1236-1243; Bruggemann and Taussig (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:455-458. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron ([http://\\_www\\_regeneron\\_com](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_harbourantibodies\\_com](http://_www_harbourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) и Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)).

Антитела человека можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг сконструирован с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их участков, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные, или спаренные переменные области антител (Knappik et al. (2000), *J. Mol. Biol.*, 296:57-86; Krebs et al. (2001), *J. Immunol. Meth.*, 254:67-84; Vaughan et al. (1996), *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al. (1998), *PITAS (USA)*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter (1991), *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581). Антитела по изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей переменные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в публикации Shi et al. (2010), *J. Mol. Biol.*, 397:385-96, и в международной патентной публикации № WO 09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2, или CD3 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы; из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG. Такие способы использования фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патентах США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих целые клетки или клеточные, или тканевые экстракты, или антиген может быть заново образован в теле животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его участок.

Создание и применение биспецифических и мультиспецифических антител к CD3.

В изобретении предложены биспецифические и мультиспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. Второй антиген может представлять собой опухолеассоциированный антиген (ТАА) или антиген на патогенных клетках.

Примеры антител к CD3, которые можно использовать для получения биспецифических и мультиспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, включают антитела к CD3, содержащие последовательности V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> и CDR тяжелой/легкой цепи, приведенные в табл. 7А и 7В соответственно, и их сконструированные варианты, описанные в табл. 10 и 11, а также в сопроводительном тексте. Например, CDR и/или домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антител к CD3 CD3В312, CD3В313, CD3В314, CD3В315, CD3В316, CD3В317, CD3В337, CD3В373, CD3В376, CD3В389, CD3В450 и CD3В467, описанных в настоящем документе, могут быть использованы для получения биспецифических и мультиспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

Описанные в настоящем документе CDR и/или домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антител к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

Описанные в настоящем документе CDR и/или домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие PSMA-связывающие домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>, описанные в настоящем документе и в табл. 18. Описанные в настоящем документе CDR и/или домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие IL1RAP-связывающие домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>, описанные в настоящем документе и в табл. 25. Описанные в настоящем документе CDR и/или домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие CD33-связывающие домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>, описанные в настоящем документе и в табл. 33. Например, домены V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> антител к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, и PSMB365, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения биспецифических антител к PSMA×CD3.

Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, TMEFF2 и IL1RAP. Иллюстративные мультиспецифические антитела к PSMA×CD3, CD33×CD3, TMEFF2×CD3 и IL1RAP×CD3, предложенные в настоящем документе, имеют первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP. Иллюстративные антитела к PSMA, которые можно использовать для получения биспецифических молекул к PSMA×CD3, представляют собой описанные в настоящем документе антитела, которые могут содержать последовательности тяжелой и легкой цепей, включая без ограничений последовательности тяжелой и легкой цепей, перечисленные в табл. 18. Иллюстративные антитела к IL1RAP, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к IL1RAP×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, включая без ограничений последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в табл. 30. Иллюстративные антитела к CD33, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к CD33×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, включая без ограничений последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в табл. 38. Иллюстративные антитела к TMEFF2, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к TMEFF2×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, включая без ограничений последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в табл. 52, 59-61.

Созданные биспецифические антитела можно протестировать на их связывание с CD3 и/или вторым антигеном и/или на их желательные функциональные характеристики, такие как опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, которые экспрессируют второй антиген.

Предложенные в данном документе биспецифические антитела включают антитела, имеющие полноразмерную структуру антитела.

Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, специфически связывающуюся с антигеном.

Полноразмерные биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в поверхность взаимодействия СН3 тяжелой цепи в каждой

полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, или *in vitro* в бесклеточной среде, или с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых связывает отдельный эпитоп, то есть эпитоп на CD3 и эпитоп на втором антигене.

Термин "гомодимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин "гомодимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Термин "гетеродимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. "Гетеродимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают конструкторы, такие как Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), "выступы во впадины" (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody® Technology (Genmab A/S).

Технологию Triomab quadroma можно применять для получения полноразмерных биспецифических антител, включающих VH и VL антител к CD3 по изобретению. Технология Triomab стимулирует обмен Fab-плечами между двумя исходными химерными антителами, одним исходным mAb, имеющим IgG2a, и вторым исходным mAb, имеющим крысиные константные области IgG2b, с получением химерных биспецифических антител.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию CrossMAb. Антитела CrossMAb дополнительно к применению стратегии обмена Fab-плечами в промоторе по типу "выступ во впадину" имеют в одной из половин плеч обмен доменами СН1 и CL для обеспечения правильного объединения в пары легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8242247).

Для создания полноразмерных биспецифических антител могут быть использованы другие стратегии перенаправления путем обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или в пределах тяжелой цепи биспецифических антител, либо в одном, либо в обоих плечах. Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, СНЗ с CL и СНЗ с СН1, как описано в патентных публикациях № WO 2009/080254, WO 2009/080251, WO 2009/018386 и WO 2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F или

T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию LUZ-Y. В этой технологии к С-концам доменов СН3 присоединяют последовательность типа лейциновой застёжки для контроля сборки гетеродимера из исходных мкАт, которую удаляют после очистки, как описано Wranik et al. (2012), J. Biol. Chem., 287(52):42221-9.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US20070287170.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, можно получать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СН3 двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746). В способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (т.е. антитело, которое специфически связывается со вторым антигеном; например, антитело к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (т.е. антитело к CD3) сконструированы так, чтобы иметь определенные замены в домене СН3, который способствует стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно вернуть к невозстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, содержит по меньшей мере одну замену в константном домене СН3 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, по меньшей мере одна замена в константном домене СН3 антитела представляет собой замену K409R, F405L или F405L и R409K, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

Домены антитела и нумерация являются хорошо известными. Термин "асимметричный" относится к неидентичным заменам в двух доменах СН3 в двух отдельных тяжелых цепях антитела. Область СН3 IgG1, как правило, состоит из остатков 341-446 на IgG1 (нумерация остатков соответствует каталогу EU).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1 и содержит замену F405L в первой тяжелой цепи (HC1) антитела и замену K409R во второй тяжелой цепи (HC2) антитела по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изотипу IgG1 и содержит замену K409R в первой тяжелой цепи (HC1) антитела и замену F405L во второй тяжелой цепи (HC2) антитела по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG4 и содержит замену S228P в HC1 и замены S228P, F405L и R409K в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изотипу IgG4 и содержит замены S228P, F405L и R409K в HC1 и замену S228P в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изотипу IgG4 и содержит замены S228P, F234A и L235A в заменах HC1 и S228P, F234A, L235A, F405L и R409K в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изотипу IgG4 и содержит замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K в HC1 и замены S228P, F234A и L235A в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь асимметричных замен в HC1 и HC2 в положениях остатков 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре асимметричных замены в HC1 и HC2 в положениях остатков 350, 370, 405 или 409, если нумерация остатков соответствует

индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну асимметричную замену в HC1 и HC2 в положениях остатков 405 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

Как правило, замены вводят в молекулу, например, в константный домен антитела, на уровне ДНК с помощью стандартных способов.

Антитела по изобретению могут быть сконструированы в виде разнообразных известных форм антител.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой кросс-тело (англ.: cross-body).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела по изобретению включают рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, в которых каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием включают молекулы (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis), антитело "два в одном" (Genentech) и mAb2 (F-Star).

В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают молекулы (DVD)-Ig с двойным переменным доменом (Abbott), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

В некоторых вариантах осуществления Fc-слитые молекулы включают слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)<sub>2</sub> (Medarex/AMGEN), "двойного действия" или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают биспецифический T-клеточный активатор (BITE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), гибриды ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), и COMBODY (EpiGen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь. Различные форматы биспецифических антител были описаны, например, в Chames and Baty (2009), *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, 12:276; и в Nunez-Prado et al. (2015), *Drug Discovery Today*, 20(5):588-594.

В табл. 2 приведены иллюстративные описанные в данном документе моноклональные антитела, которые можно использовать для создания биспецифических антител по изобретению.

Таблица 2

Иллюстративные моноклональные антитела, которые можно использовать для создания биспецифических антител по изобретению

Первый домен	Второй домен		
	анти-GITR	анти-CD33	анти-IL1RAP
анти-CD3			
CD3B312	PSMB87	C33B760	IAPB3
CD3B313	PSMB119	C33B777	IAPB9
CD3B314	PSMB120	C33B778	IAPB17
CD3B315	PSMB121	C33B782	IAPB23
CD3B316	PSMB122	C33B792	IAPB25
CD3B317	PSMB123	C33B799	IAPB29
CD3B337	PSMB124	C33B806	IAPB38
CD3B373	PSMB126	C33B830	IAPB47
CD3B376	PSMB127	C33B836	IAPB55
CD3B389	PSMB129	C33B903	IAPB57
CD3B450	PSMB130	C33B904	IAPB61
CD3B467	PSMB344	C33B905	IAPB62
	PSMB345	C33B907	IAPB63
	PSMB346	C33B908	IAPB64
	PSMB347		IAPB65
	PSMB349		
	PSMB358		
	PSMB359		
	PSMB360		
	PSMB361		
	PSMB362		
	PSMB363		
	PSMB365		

Иллюстративные антитела к TMEFF2, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к TMEFF2×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, включая без ограничений последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в табл. 52, 59-61.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. В некоторых вариантах осуществления второй или целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой ТАА. Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, TMEFF2 и IL1RAP.

В изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении клеточного пролиферативного расстройства.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который



специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении злокачественного новообразования.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении аутоиммунного заболевания.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунного расстройства.

Дополнительным аспектом изобретения является способ лечения клеточного пролиферативного расстройства, или аутоиммунного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе от около 0,01 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, местно, перорально, трансдермально, внутрибрюшинно, внутриорбитально, путем имплантации, путем ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят внутривенно.

В любом из предшествующих применений или способов клеточное пролиферативное расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака толстого кишечника, колоректального рака, рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы (НХЛ), В-клеточной лимфомы, В-клеточного лейкоза, множественной миеломы, рака почки, рака предстательной железы, рака печени, рака головы и шеи, меланомы, рака яичников, мезотелиомы, глиобластомы, В-клеточной карциномы, ДВКЛ из В-клеток герминативного центра (ГЦВ), ДВКЛ из активированных В-клеток (АВС), фолликулярной лимфомы (ФЛ), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоидного лейкоза (ХЛЛ), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), лимфоцитомы (ЛЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), лимфомы центральной нервной системы (ХНЛ), лимфомы Беркитта (ЛБ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лейкоза ворсистых клеток, лимфомы/лейкоза из клеток селезенки, не поддающегося классификации, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, экстраоссальной плазмоцитомы, экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT-лимфомы), нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской фолликулярной лимфомы, первичной кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, Т-клеточной/гистиоцитарной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, первичной ДВКЛ ЦНС, первичной кожной ДВКЛ, ножного типа, EBV-положительного ДВКЛ пожилых, ДВКЛ, ассоциированной с хроническим воспалением, лимфогранулематоза, первичной медиастинальной (тимусной) В-крупноклеточной лимфомы. Внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK-позитивной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, плазмобластной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастанмана, первичной выпотной лимфомы: В-клеточной лимфомы, не поддающегося классификации, с признаками, промежуточными между

диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лимфомой Беркитта, и В-клеточной лимфомы, не поддающейся классификации, с признаками, промежуточными между диффузной В-крупноклеточной лимфомой, классической лимфомой Ходжкина, и амилоидоза легких цепей.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой аденокарциному, например, метастатическую аденокарциному (например, колоректальную аденокарциному, аденокарциному желудка или аденокарциному поджелудочной железы).

В любом из предшествующих применений или способов аутоиммунное расстройство может быть выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), болезни Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полинейропатии, миастении гравис, васкулита, сахарного диабета, синдром Рейно, синдром Шегрена, гломерулонефрита, оптикомиелита (NMO), IgG -нейропатии.

В другом аспекте изобретение относится к набору, содержащему (а) композицию, содержащую любое из предшествующих антител к CD3 или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению; и (b) листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению композиции субъекту для лечения или задержки прогрессирования клеточного пролиферативного расстройства. Термин "листок-вкладыш в упаковке" используется для обозначения инструкций, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов для продажи, содержащие информацию о показаниях, использовании, дозах, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, которые касаются использования таких терапевтических продуктов.

В любом из предшествующих применений или способов субъектом может представлять собой человека.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева.

Также описаны выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антитела к CD3 по изобретению или биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать переменные домены, предложенные в настоящем документе, могут быть включены в одни и те же или разные векторы для получения антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению включают полинуклеотид, кодирующий лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Полинуклеотид, кодирующий лидерную последовательность, может включать сайт расщепления рестрикционной эндонуклеазы или сайт инициации трансляции.

Также предложены векторы, содержащие полинуклеотиды по изобретению. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся без ограничений плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным векторам экспрессии, входящим в объем описания, относятся синтетические или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol., 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся без ограничений немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность PSMA-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента находится под контролем индуцибельного промотора, например, промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более интерферон-стимулируемых реагирующих элементов (ISRE), промоторов протеинкиназы R 2',5'-олигоденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т.п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т.е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловириной селекции или ген бактериальной пуриноклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7, Gene Ther., 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для создания антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP или клеток, продуцирующих антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, в изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая векторы по изобретению.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся без ограничений перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т.п. (описано в публикации Cline, 29, Pharmac. Ther., 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, подходящим для применения в экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHOК1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK 293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и др. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные векторами экспрессии по изобретению, можно подвергнуть селекции или скринингу в отношении рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Фармацевтические композиции/введение.

В изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможна подготовка антител по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-ный солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их стерилизацию можно проводить с использованием общепринятых, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т.д. Концентрация антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1 и до 15 или 20 вес.%, и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21-е издание, под ред. Troy, D.B., Lipincott Williams and Wilkins, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, 2006 г., часть 5, Pharmaceutical Manufacturing, с. 691-1092, см. особенно с. 958-989.

Способом введения для терапевтического применения антител по изобретению может служить любой приемлемый путь доставки антитела в организм-хозяин, такой как парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, легочное, чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), в виде состава в таблетке, капсуле, растворе, порошке, геле, частице; и введении антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством доставки в опухоль, сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Антитела по изобретению можно вводить субъекту любым подходящим путем, например, парентерально путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно. Внутривенная инфузия может продолжаться, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая субъекту, является достаточной для ослабления или, по меньшей мере, частичного торможения заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 мг до около 100 мг/кг, например от около 0,05 мг до около 30 мг/кг, или от около 5 мг до около 25 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например, 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м<sup>2</sup>. Для лечения пациенту обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител по изобретению можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель,

шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, описанные в данном документе антитела по изобретению можно вводить в дозе 8 или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Например, антитела в способах, описанных в настоящем документе, могут быть предоставлены в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в один из суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или альтернативно по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч, или в любой их комбинации.

Антитела в способах, описанных в настоящем документе, также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития злокачественного новообразования, замедлить начало развития событий при прогрессировании злокачественного новообразования и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии злокачественного новообразования.

Предложенные в данном документе антитела могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо - известные методики лиофилизации и восстановления.

Способы обнаружения CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или целевого антигена и CD3.

В данном документе предложены способы обнаружения CD3, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP в образце, включающие получение образца, приведение образца в контакт с антителом к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP по изобретению и обнаружение антитела, связанного с CD3, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP в образце.

Дополнительно предложены способы обнаружения CD3 и второго антигена (например, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP) в образце, включающие получение образца, приведение образца в контакт с биспецифическим антителом, содержащим первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, и обнаружение антитела, связанного с CD3 и вторым антигеном в образце.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, образец можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, биоптатов, включая полученные с помощью тонкоигльной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

Антитела изобретения могут быть обнаружены с использованием известных способов. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, In-DOTA, <sup>111</sup>In-диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТРА), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Предложенные в настоящем документе антитела могут быть использованы в различных анализах для обнаружения CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3 и второго антигена в образце. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Наборы антител.

В изобретении также предложен набор, содержащий одно или более из антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP, или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению или его антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения антител к CD3, к PSMA, к CD33, антител к TMEFF2 или к IL1RAP, или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывается с CD3, и второй домен, который специфически связывается со вторым антигеном по изобретению, или других способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут содержать антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в

настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении присутствия CD3 или второго антигена, такого как PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2, в биологическом образце. Соответственно описанные наборы могут содержать одно или более антител, или его(их) антигенсвязывающий(ые) фрагмент(ы), описанный(ые) в настоящем документе, и сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не применяются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченые с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает PSMA. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает CD33. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает IL1RAP. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает TMEFF2.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения присутствия CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 и/или второго антигена в биологическом образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, описанное в настоящем документе, и реагенты для обнаружения антитела. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, находящееся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

CD3-специфические антитела.

В настоящем документе описаны выделенные антитела к CD3. Антитела к CD3 по изобретению связывают CD3 человека и необязательно CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 по изобретению и их фрагменты связывают CD3 человека и яванского макака с аффинностями в пределах 5 раз относительно друг друга. Другими словами, кратность разницы в связывании антител равна менее 5. В этом случае антитело к CD3 по изобретению можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля CD3 у приматов, так и в качестве лекарственного средства для людей. Другими словами, одна и та же CD3-специфическая молекула может применяться в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях с участием людей. Эта перекрестная реактивность между человеком и макаком приводит к очень сопоставимым результатам и значительно более высокой прогностической способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению связывают эпитоп, образованный субъединицами CD3e/d. CD3-специфические антитела могут быть человеческими, гуманизированными или химерными. В качестве примера в настоящем документе также приводятся человеческие антитела, полученные в OmniRat (Open Monoclonal Technologies ("OMT"), г. Пало-Альто, штат Калифорния, США, omniab.com).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело к CD3 или его фрагмент имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Mus musculus* с расчетной EC<sub>50</sub> 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Mus musculus*, с расчетной EC<sub>50</sub> 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC<sub>50</sub> между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Mus musculus*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC<sub>50</sub> измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

б) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691) или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3e от *Mus musculus* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (K<sub>D</sub>) 12 нМ или менее, причем K<sub>D</sub> измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

с) демонстрирует отсутствие окисления метионина или триптофана, или отсутствие деамидирования аспарагина, или демонстрирует отсутствие изомеризации аспарагина по результатам анализа методом пептидного картирования;

д) связывает остатки 1-6 CD3e при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

е) активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и cOKT3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией

флуоресценции.

Антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению имеют аффинность связывания *in vitro* ( $K_d$ ) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 5 нМ до около 300 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В некоторых аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению представляют собой двухвалентные антитела, имеющие аффинность связывания *in vitro* ( $K_d$ ) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 5 нМ до около 300 нМ, наиболее предпочтительно около 100 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В некоторых аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению представляют собой одновалентные конструкторы, имеющие аффинность связывания *in vitro* ( $K_d$ ) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 100 нМ до около 250 нМ, наиболее предпочтительно около 250 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты, описанные в настоящем документе, конкурируют с коммерческим антителом к CD3 SP34-2 (BD Biosciences 551916) за связывание с CD3, как определено с помощью анализа конкурентного связывания с использованием конъюгированного с AlexaFluor 488 антитела SP34-2 на первичных человеческих Т-клетках при измерении с помощью проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты не демонстрируют посттрансляционной модификации, включая отсутствие окисления, отсутствие деамидирования и отсутствие изомеризации аспартата при определении методом пептидного картирования.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты эффективны для активации Т-клеток и индукции экспрессии CD69 в той же степени, что и SP34-2, в Т-клетках человека и яванского макака и сОКТ3 в Т-клетках человека, при определении посредством Т-клеточного анализа с использованием проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты, описанные в настоящем документе, имеют общую энтальпию разворачивания около 400 ккал/моль или более, около 410 ккал/моль или более, около 420 ккал/моль или более, около 430 ккал/моль или более, около 440 ккал/моль или более, около 45 ккал/моль или более, около 460 ккал/моль или более, около 470 ккал/моль или более, около 480 ккал/моль или более, около 490 ккал/моль или более, около 500 ккал/моль или более, около 510 ккал/моль или более, около 520 ккал/моль или более, около 530 ккал/моль или более, около 540 ккал/моль или более или около 550 ккал/моль или более. В определенных аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению имеют общую энтальпию разворачивания около 418 ккал/моль, 545 ккал/моль, около 402 ккал/моль или около 406 ккал/моль, а антитела к CD3 представляют собой молекулы CD3B376 (IgG4 PAA), CD3B450 (IgG4 PAA), CD3B389 (IgG1sigma) и CD3B467 (IgG1sigma) соответственно.

Примеры таких антител включают CD3B311, CD3B312, CD3B313, CD3B314, CD3B315, CD3B316, CD3B317, CD3B334, CD3B376 CD3B389, CD3B450 и CD3B467, и CD3B376 и CD3B450, сконструированные в одновалентный формат.

Антитела к CD3 или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут присутствовать в различных формах, но будут содержать один или более сегментов варибельного домена или CDR антитела, приведенных в табл. 7А, и их сконструированных вариантов, например, приведенных или описанных в табл. 9 и 10, и в сопровождающих их описаниях.

В изобретении также предложено антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в табл. 7В. В изобретении также предложено антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в табл. 7В, и легкую цепь, содержащую LCDR1, а LCDR2 и LCDR3 любого из антител, описанных в

табл. 7В. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению конкурирует за связывание с CD3 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в табл. 7В, и легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 любого из антител, описанных в табл. 7В.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 651, 652, 653, 654, 655, 687 или 656, при этом HCDR1, HCDR2 и HCDR3 определены по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 658, 659, 694, 660, 688, или 661, при этом LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 662, 665, или 666;  
HCDR2 с SEQ ID NO: 663, 689 или 695; и  
HCDR3 с SEQ ID NO: 664.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

LCDR1 с SEQ ID NO: 773, 710, 674 или 671;  
LCDR2 с SEQ ID NO: 669 или 673; и  
LCDR3 с SEQ ID NO: 670.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 662, 665 или 666;  
HCDR2 с SEQ ID NO: 663, 689 или 695;  
HCDR3 с SEQ ID NO: 664;  
LCDR1 с SEQ ID NO: 773, 710, 674 или 671;  
LCDR2 с SEQ ID NO: 669 или 673; и  
LCDR3 с SEQ ID NO: 670.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

SEQ ID NO: 662, 663 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 662, 695 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 665, 663 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 665, 695 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 662, 689 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 666, 663 и 664 соответственно;  
SEQ ID NO: 666, 695 и 664 соответственно  
SEQ ID NO: 665, 689 и 664 соответственно; или  
SEQ ID NO: 666, 689, 664 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 773, 669 и 670 соответственно;  
SEQ ID NO: 773, 673 и 670 соответственно;  
SEQ ID NO: 710, 673 и 670 соответственно;  
SEQ ID NO: 674, 673 и 670 соответственно;  
SEQ ID NO: 671, 673 и 690 соответственно;  
SEQ ID NO: 773, 673 и 690 соответственно;  
SEQ ID NO: 671, 669 и 670 соответственно; или  
SEQ ID NO: 776, 673 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 669 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 669 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по





В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 689, 664, 671, 673 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 710, 673 и 670 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит последовательность тяжелой цепи (HC) с SEQ ID NO: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644 и/или последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 645, 716, 649, 676, 677, или 650. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HC, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644, и LC, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 645, 716, 649, 676, 677 или 650. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HC, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644, и LC, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 645, 716, 649, 676, 677 или 650, причем изменение последовательности не происходит в области CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687 или 656, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 658, 659, 694, 660, 688, 678 или 661. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит VH, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687 или 656, и VL, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична

SEQ ID NO 658, 659, 694, 660, 688, 678 или 661. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит VH, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687, или 656, и VL, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична

SEQ ID NO: 658, 659, 694, 660, 688, 678, или 661, причем изменение последовательности не происходит в области CDR.

PSMA-специфические антитела.

Антитела и их фрагменты, которые связываются с PSMA, связываются с целевым антигеном шимпанзе. В одном варианте осуществления антитела и их фрагменты связываются с целевыми антигенами PSMA человека и макака с аффинностями в пределах 5 раз относительно друг друга. Другими словами, кратность разницы в связывании антител равна менее 5. В этом случае идентичную молекулу антитела можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля PSMA у приматов, так и в качестве лекарственного средства для людей. Другими словами, одна и та же PSMA-специфическая молекула может применяться в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях с участием людей. Это приводит к очень сопоставимым результатам и значительно более высокой прогностической способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. Поскольку домен PSMA обладает межвидовой специфичностью, то есть реагирует с антигенами человека и макака, антитело или его фрагменты по изобретению можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля этих связывающих доменов у приматов, так и (в идентичной форме) как лекарственное средство для людей.

В настоящем изобретении также предложены мультиспецифические антитела, которые специфически связываются с PSMA. Согласно изобретению биспецифическое, то есть бифункциональное, антитело можно использовать для воздействия на две разные терапевтические мишени или для выполнения двух разных функций. Такие антитела можно использовать, например, для рекрутирования иммунной эффекторной клетки, например, Т-или NK-клетки, к конкретной клетке-мишени. Известны и исследуются различные молекулы на основе фрагментов антител, например, для лечения злокачественного новообразования.

В настоящем изобретении также предложено биспецифическое антитело к PSMA × эффекторному антигену". В одном варианте осуществления эффекторный антиген для биспецифического антитела к PSMA × "эффекторному антигену" представляет собой CD3. В настоящем изобретении было обнаружено, что можно получить биспецифическое антитело к PSMA×CD3, в котором идентичная молекула может быть использована в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях и даже в терапии у людей. Это связано с идентификацией биспецифического антитела к PSMA×CD3, которое, помимо связывания с PSMA человека и CD3 человека, соответственно, также связывается с гомологами антигенов шимпанзе и макака. Биспецифическое антитело к PSMA×CD3 по изобретению можно использовать в качестве терапевтического агента против различных заболеваний, включая, но не ограничиваясь, злокачественное новообразование. Ввиду вышеизложенного отпадает необходимость в конструировании суррогатного целевого биспецифического антитела к PSMA×CD3 для тестирования на филогенетически далеких (от человека) видах. В результате идентичная молекула может использоваться в доклинических исследованиях на животных, поскольку предназначена для введения людям в клинических испытаниях, а также после регистрации и одобрения Управлением по контролю за изделиями медицинского назначения.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, выделенное антитело или его фрагмент антитела, которое специфически связывает PSMA, имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) связывает внеклеточный домен (ВКД) PSMA Pan troglodytes с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) 25 нМ или менее, при этом  $K_D$  измеряется с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

б) связывает клетки LNCaP с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывает клетки HEK, экспрессирующие PSMA *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC50 между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток HEK, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

в) связывает ВКД рекомбинантного PSMA от человека (SEQ ID NO: 55), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 52) и *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 53) с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) 12 нМ или менее, при этом  $K_D$  измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

г) демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток HEK, экспрессирующих PSMA человека, или клеток HEK, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7; или

е) распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 51).

Примеры таких антител или их фрагментов представляют собой антитела к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, и PSMB365, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 и 61 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66 и 66 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 60 и 61 соответственно.



LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 683, 80, 81, 792 и 686 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA, по изобретению, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 121, 123, 125, 126, 128, 130 или 681. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в данном документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 9, 111, 113, 115, 117, 119, 122, 124, 127, 129, 131 или 682.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA, по изобретению, содержит последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12, 13, 132, 134, 136, 138, 140, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 151 или 679.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в данном документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 14, 15, 75, 133, 135, 137, 139, 142, 144, 147, 149 или 680.

CD33-специфические антитела.

CD33-специфические антитела согласно настоящему изобретению обладают одним или более желательными функциональными свойствами, включая без ограничений высокую аффинность связывания с CD33 и/или CD3, высокую специфичность к CD33 и/или CD3 и способность лечить или предотвращать злокачественное новообразование при введении отдельно или в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами.

В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C2-домен CD33. В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают V-домен CD33. Полноразмерный человеческий CD33 представлен компанией Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 244).

В контексте настоящего документа антитело, которое "специфически связывается с CD33", относится к антителу, которое связывается с CD33, предпочтительно с CD33 человека, предпочтительно с C2-доменом CD33, с  $KD$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее, предпочтительно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $5 \times 10^{-10}$  М или менее или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут содержать одну или более CDR антитела, как показано в табл. 34 и 35.

В настоящем документе описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD33. В некоторых вариантах осуществления CD33-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя CD33-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 34. В некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 34, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 35.

В некоторых вариантах осуществления предложено CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, приведенную в табл. 33. В некоторых вариантах осуществления предложено CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи, приведенную в табл. 33.

Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антител, обсуждаемых в этом разделе и приведенных в табл. 33, подходят для включения в биспецифические конструкторы. Например, в некоторых вариантах осуществления биспецифических антител к CD33, эффекторное плечо представляет собой плечо к CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 670 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 670 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33×CD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент

содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 267, 260, 275, 270, 262, 258, 257, 281, 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 287, 314, 309, 301, 298, 297, 290, 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325; и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 257 или 258, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 298 или 299.

IL1RAP-специфические антитела.

Используемые в настоящем документе термины "акцессорный белок рецептора интерлейкина-1", "IL1RAP" и "IL1-RAP" конкретно включают человеческий белок IL1RAP (SEQ ID NO: 576), например, как описывается в каталоге Genbank под номером доступа AAB84059, эталонная последовательность NCBI: NP\_002173.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9NPH3-1 (см. также Huang et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94 (24), 12829-12832). В научной литературе IL1RAP также известен как IL1 R3, C3orf13, FLJ37788, IL-1 RAcP и EG3556.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 24.

В настоящем документе описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления IL1RAP-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя IL1RAP-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 24. В некоторых вариантах осуществления предлагается IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 24, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 24.

В некоторых вариантах осуществления предложено IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи любого из антител, приведенных в табл. 25. В некоторых вариантах осуществления предложено IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область легкой цепи любого из антител, приведенных в табл. 25. В некоторых вариантах осуществления предложено IL1RAP-специфическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи по любому одному из антител, приведенных в табл. 25.

Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антител, обсуждаемых в этом разделе и приведенных в табл. 25, подходят для включения в биспецифические конструкторы, в которых нацеливающее плечо представляет собой плечо к IL1RAP. Например, в некоторых вариантах осуществления биспецифических антител к IL1RAP, эффекторное плечо представляет собой плечо к CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 670 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAP×CD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

TMEFF2-специфические антитела.

В изобретении предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью с SEQ ID NO: 629 TMEFF2. Антитела к TMEFF2 по изобретению, которые связывают мембранную проксимальную область TMEFF2, не интернализируются клетками. Не желая связывать себя какой-либо конкретной теорией, можно ожидать, что неинтернализирующие антитела к TMEFF2 имеют повышенный онкогенный эффект, опосредованный эффекторными функциями антитела, в результате отсутствия интернализации и деградации TMEFF2 по сравнению с интернализирующими антителами к TMEFF2.

"Связывается с мембранной проксимальной областью" означает, что 90% остатков эпитопа антитела, идентифицированных с использованием водород-дейтериевого обмена (H/D обмен), находятся в мембранной проксимальной области TMEFF2. Остатки эпитопа представляют собой те, которые защищены тестируемым антителом за счет разницы в уровнях дейтерирования в по меньшей мере 5% посредством H/D обмена. Примерами таких антител являются TMEB675, TMEB570, TMEB674, TMEB565, TMEB762 и TMEB757, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 592) или DAGYTGQHCEKDYSLV (SEQ ID NO: 600) с мембранной проксимальной областью TMEFF2. Иллюстративное связывание антитела к TMEFF2 в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 592) представляет собой TMEB570. Иллюстративное связывание антитела к TMEFF2 в пределах остатков DAGYTGQHCEKDYSLV (SEQ ID NO: 600) представляет собой TMEB675. Ожидается, что варианты TMEB675 TMEB762 и TMEB757 будут связываться с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в пределах остатков DAGYTGQHCEKDYSLV (SEQ ID NO: 600).

При анализе H/D обмена ВКД рекомбинантно экспрессированного TMEFF2 инкубируют в присутствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение предварительно заданных периодов времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов с использованием методом ЖХ-МС. Анализ H/D обмена можно проводить с использованием известных протоколов. Иллюстративный протокол описан в примере 5.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим варируемую область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и варируемую область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, или VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

Конкуренцию за связывание исследуемого антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 и эталонного антитела можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных способов. Например, связывание меченого сложным эфиром NHS MSD Sulfo-Tag исследуемого антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в присутствии немеченого эталонного антитела можно оценить при помощи анализов методом твердофазного ИФА, или Bioacore или при помощи проточной цитометрии могут быть использованы для демонстрации конкуренции. Исследуемое антитело конкурирует за связывание с TMEFF2 с эталонным антителом, если исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с проксимальной мембранной областью TMEFF2 на 85% или более, например, на 90% или более, или 95% или более.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22 соответственно;

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24 соответственно;

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22 соответственно; или

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $0,4 \times 10^{-9}$  М или менее, при этом  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с  $K_D$  от около  $0,1 \times 10^{-10}$  М до около  $0,4 \times 10^{-9}$  М.

Аффинность антитела к мембранной проксимальной области TMEFF2 может быть определена экспериментально с использованием любого подходящего способа. Иллюстративный способ включает применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, твердофазный иммуносорбентный ферментный анализ (ИФА) или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности антитела к TMEFF2 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$  и  $K_{off}$ ), как правило, выполняют в стандартизированных условиях и с применением стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя

ошибка измерений аффинности, например, с применением Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, для измерений может находиться в пределах 5-33%, оказываясь в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в отношении значения  $K_D$  характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное COC для  $K_D$ , равной  $1 \times 10^{-9}$  М, составляет до  $\pm 0,33 \times 10^{-9}$  М.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас области тяжелой цепи (VH), полученный из VH3\_3-23 (SEQ ID NO: 53) или VH1\_1-69 (SEQ ID NO: 54).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас варибельной области легкой цепи (VL), полученный из VKI\_L11 (SEQ ID NO: 55) или VKIII\_A27 (SEQ ID NO: 591).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH3\_3-23 с SEQ ID NO: 53 и VKI\_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH1\_1-69 SEQ ID NO: 54 и VKIII\_A27 с SEQ ID NO: 591 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH1\_1-69 SEQ ID NO: 54 и VKI\_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно.

Антитела, содержащие варибельные области тяжелой или легкой цепи, "полученные из" конкретной последовательности каркаса или зародышевой линии, относятся к антителам, полученным из системы, которая использует гены иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, например, от трансгенных мышей, крыс или кур, или из библиотек фагового дисплея, как обсуждается в данном документе. Антитело, содержащее конкретный каркас, полученную из последовательности зародышевой линии, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью, из которой оно было получено, из-за, например, естественно возникающих соматических мутаций или намеренно введенных замен.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 39 и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 32 и LC с SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 46 и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 49.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40 и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47 и LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 50.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 41 и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 34 и LC с SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 48, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 51.



В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40 и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47 и LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 590.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 618, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 619.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 614 и LC с SEQ ID NO: 615.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 620, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 621.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 622, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 623.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 616 и LC с SEQ ID NO: 617.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 624, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 625.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает T-клеточный антиген.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3-эпсилон.

Последовательности VH, VL, HCDR, LCDR, HC и LC иллюстративных антител к TMEFF2 по настоящему изобретению показаны в табл. 53-60.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, включают пары переменных доменов, одну из тяжелой цепи и одну из легкой цепи, специалисту в данной области техники будет понятно, что альтернативные варианты осуществления могут включать одиночные переменные домены тяжелой или легкой цепи. Одиночный переменный домен можно использовать для скрининга переменных доменов, способных образовывать двухдоменный специфический антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с TMEFF2. Скрининг можно проводить посредством скрининга фагового дисплея, например, с применением иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в международной патентной публикации № WO 1992/01047. Согласно этому подходу отдельную колонию, содержащую клон либо с VH-, либо с VL-цепью, применяют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (VL или VH), и полученный двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен отбирают в соответствии с методиками фагового дисплея, применяя известные способы и способы, описанные в настоящем документе. Следовательно, отдельные полипептидные цепи VH и VL можно использовать для идентификации дополнительных антител к TMEFF2 с использованием способов, раскрытых в международной патентной заявке № WO 1992/01047.

Биспецифические антитела к TMEFF2/CD3.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый домен, который связывает TMEFF2, и второй

домен, который связывает CD3, причем антитело связывается с мембранной проксимальной мембранной TMEFF2. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, биспецифические антитела, которые связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2, могут быть более эффективными в опосредованном Т-клетками уничтожении опухолевых клеток.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом антитело конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим вариabельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и вариabельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, или VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мембранную проксимальную область TMEFF2 с константной диссоциации ( $K_D$ ) около  $0,4 \times 10^{-9}$  М или менее, при этом  $K_D$  измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мембранную проксимальную область TMEFF2 с  $K_D$  от около  $0,1 \times 10^{-10}$  М до около  $0,4 \times 10^{-9}$  М.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22 соответственно;  
 SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23 соответственно;  
 SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24 соответственно;  
 SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22 соответственно; или  
 SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом первый домен содержит

VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28;  
 VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29;  
 VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;  
 VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31;  
 VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607; или  
 VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом второй домен содержит

VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661.

В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 658.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585,



биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 616, LC1 с SEQ ID NO: 617, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 616, LC1 с SEQ ID NO: 617, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

#### Варианты осуществления

В данном изобретении предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

1. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

а) тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

б) варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661;

с) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 676;

д) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 773, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

е) варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или

ф) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 678.

2. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

3. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, в котором аффинность связывания составляет около 100 нМ или менее.

4. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2 или 3, в котором аффинность связывания измеряют с помощью проточной цитометрии или анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C.

5. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три или четыре из следующих свойств:

а) связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 300 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 300 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

б) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3e от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) 300 нМ или менее, в котором  $K_D$  измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

с) связывает остатки 1-6 CD3e при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

д) активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене антитела, причем по меньшей мере одна замена включает

а) замены в тяжелой цепи K409R, F405L или F405L и R409K;

б) замены в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A;

с) замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S, при этом антитело относится к изотипу IgG1; или

д) замену в тяжелой цепи S228P, при этом антитело относится к изотипу IgG4, в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов

осуществления, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащие вариabельную область тяжелой цепи (VH) и вариabельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащие последовательность тяжелой цепи (HC) и последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690 соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, содержащие VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-5, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690 соответственно.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело является человеческим или гуманизированным.

20. Антитело по варианту осуществления 19, в котором антитело относится к изотипу IgG4 или IgG1.

21. Антитело по варианту осуществления 20, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

22. Антитело по варианту осуществления 18, содержащее

a) замены в легкой цепи D43G, L49M, L50I, S62N, Q85E;

b) замены в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E, H89Y;

c) замены в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R70K, T83S, L96V;

d) любую одну из замен в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E или H89Y; или

e) любую одну из замен в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R79K, T83S или L96V, при этом нумерация остатков для замен в легкой цепи соответствует SEQ ID NO: 661, а для замен в тяжелой цепи соответствуют SEQ ID NO: 652.

23. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело является биспецифическим или мультиспецифическим.

24. Биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

25. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, и при этом первый или второй домен содержит замены в тяжелой цепи S228P, F234A, L235A, F405L и R409K, а другой домен из первого или второго домена содержит замену в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

26. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый и/или второй домен содержит по меньшей мере одну замену в константном домене CH3, содержащем замену F405L или F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

27. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи F405L, а другой из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи K409R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

28. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, при этом один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи S228P, F405L и R409K, а другой из первого или второго доменов содержит замены в тяжелой цепи S228P, F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

29. Биспецифическое антитело по п.24, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652

и 661 соответственно.

30. Биспецифическое антитело по п.24, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

31. Биспецифическое антитело по п.24, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

32. Биспецифическое антитело по п.24, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

33. Биспецифическое антитело по п.24, в котором второй антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки.

34. Биспецифическое антитело по п.33, в котором антиген клеточной поверхности представляет собой опухолеассоциированный антиген.

35. Биспецифическое антитело по любому из пп.24-34, в котором второй антиген представляет собой CD33, IL1RAP, PSMA или TMEFF2.

36. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 35, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 683, 80, 81, 792 и 686 соответственно.

37. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 681 и 682 соответственно.

38. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно; и в котором второй домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 679 и 680 соответственно.

39. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 3, 80, 81, 792 и 686 соответственно.

40. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 8 и 682 соответственно.

41. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно; и в котором второй домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 13 и 680 соответственно.

42. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82 и 83 соответственно.

43. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 116 и 117 соответственно.

44. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно; и в котором второй домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 138 и 139 соответственно.

45. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 164, 165, 166, 167, 168 и 169 соответственно.

46. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 215 и 216 соответственно.

47. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 349, 390, 341, 471, 513 и 555 соответственно.

48. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 267 и 306 соответственно.

49. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670 соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 363, 404, 445, 485, 527 и 569 соответственно.

50. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно; и где второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 281 и 320 соответственно.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

52. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из вариантов осуществления 1-50.

53. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 52.

54. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 53.

55. Способ получения антитела по любому из вариантов осуществления 1-50, включающий культивирование клетки-хозяина согласно варианту осуществления 52 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

56. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из вариантов осуществления 1-50 субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

57. Способ согласно варианту осуществления изобретения 56, в котором злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

58. Способ по варианту осуществления 57, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

59. Способ по варианту осуществления 58, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы или злокачественный рак предстательной железы.

60. Способ по варианту осуществления 57, в котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритических клеток (ОБПДК).

61. Способ по любому из пп.56-60, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

62. Антитело по любому из вариантов осуществления 1-50 для применения в терапии.

63. Связывание антиидиотипического антитела с антителом по любому из вариантов осуществления 1-50.

### Примеры

1. Создание de novo и определение функциональных характеристик мкАт к CD3.

1.1. Иммунизация OmniRat® антигенами CD3 для получения моноклональных антител к CD3.

OmniRat® иммунизировали патентованными векторами (Aldevron, г. Фарго, штат Северная Дакота, США), кодирующими CD3ε человека и Cd3d человека; CD3ε яванского макака и CD3d яванского макака. Животные получали чередующиеся бусты ДНК человека и яванского макака. Начиная с 6-го применения животные получали оптимизированные векторы с той же вставкой. Клетки из лимфатических узлов сливали с клеточной линией миеломы Ag8. После истощения IgM 40 миллионов клеток из гибридной BLW помещали в три 96-луночных планшета. 133 миллионов клеток из гибридной BLX помещали в девять 96-луночных планшетов без истощения IgM.

Супернатанты гибридом из гибридов BLW (с магнитными гранулами, истощающими лимфоциты) и BLX (без магнитных гранул, истощающих лимфоциты) анализировали а) с помощью клеточного ИФА (CELISA) на клетках, временно трансфицированных кДНК человека и яванского макака, клонированными в векторы для скрининга: pOPT-CD3ε-hum-epsilon-TCE.OMT+pOPT-CD3d-hum-delta.OMT, 1:1 (pOPT-CD3ε/d-hum-mix) и pcDNA3.1-CD3ε-cyn-delta+pcDNA3.1-CD3d-cyn-delta, 1:1 (pcDNA3.1-CD3ε/d-cyn-mix). Последовательности кДНК человека и яванского макака (и соответствующие аминокислотные последовательности) представлены в табл. 4. Для CELISA-отрицательного контроля нетрансфицированные клетки млекопитающих инкубировали с супернатантами гибридом и детектировали с помощью вторичных антител Bethyl. Для CELISA-контроля трансфекции клетки млекопитающих, трансфицированные вышеописанными конструктами, детектировали с помощью антител к метке.

Супернатанты гибридом дополнительно анализировали методом проточной цитометрии (FACS) на CD3-положительных и CD3-отрицательных клетках Jurkat: Jurkat CD3+ (E6-1) и Jurkat CD3- (J.RT3-T3.5). Для FACS-отрицательного контроля CD3-отрицательные клетки Jurkat (J.RT3-T3.5) инкубировали с

буфером для разведения и обнаруживали с помощью конъюгированных с ПХ вторичных антител к крысиному Ig крысы от Southern и с помощью конъюгированных с ПХ вторичных антител к крысиному IgG1, 2a, 2b, 2c.

Специфичность антител в супернатантах гибридом из гибридной BLW и гибридной BLX для комплекса CD3e/d человека и яванского макака, презентуемого на временно трансфицированных клетках, или, в случае комплекса CD3e/d человека на клетках Jurkat CD3+ (E6-1), была продемонстрирована с помощью CELISA на временно трансфицированных клетках, а также при исследовании с помощью FACS на клеточных линиях Jurkat (табл. 3). В экспериментальных образцах, которые служили в качестве отрицательных контролей, значимый сигнал не обнаруживали.

Таблица 3

Тестирование специфичности отдельных супернатантов гибридом с помощью клеточного ИФА (сверху) и проточной цитометрии (снизу)

		Клеточный ИФА (относительные единицы флуоресценции)					
		Супернатанты гибридом, инкубированные с клетками,					
		трансфицированными:					
		рОПТ-CD3e/d-hum-mix	pcDNA3.1-CD3e/d-sup-mix		Нетрансфицированные CHO в виде отрицательного контроля		
		BLW: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (применяли истощение IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных
1	BLW-2B4	689	101	230	47	30	
2	BLW-2E6	231	34	121	25	20	
3	BLW-3B4	867	127	320	66	24	
		BLX: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (без истощения IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных
4	BLX-1F8	689	101	230	47	30	
5	BLX-2E9	867	127	320	66	24	
6	BLX-3F4	896	131	371	76	17	
7	BLX-3G8	759	111	340	70	22	
8	BLX-4D9	1042	153	483	99	24	
9	BLX-6A2	110	16	38	8	19	
	Положительный контроль	682	100	488	100	-	
	Отрицательный контроль	25	4	42	9	-	
		Проточная цитометрия (FACS)					
		Супернатанты гибридом, инкубированные на клеточной линии Jurkat					
		Jurkat CD3+ (E6-1)	Jurkat CD3- (J.RT3.T3.5) в виде отрицательного контроля				
		BLW: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (применяли истощение IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	геометрическое среднее	% положительных	геометрическое среднее	% положительных		
1	BLW-2B4	148034	53	4012			
2	BLW-2E6	7503	3	687			
3	BLW-3B4	198849	72	2884			



		BLX: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (без истощения IgM+ с использованием магнитных гранул)			
Нет	Клон	геометрическое среднее	% положительных	геометрическое среднее	% положительных
4	BLX-1F8	148034	53	4012	
5	BLX-2E9	198849	72	2884	
6	BLX-3F4	181963	66	4613	
7	BLX-3G8	214697	77	3096	
8	BLX-4D9	25839	9	1471	
9	BLX-6A2	3385	1	1219	
	Положительный контроль	277338	100	2051	
	Отрицательный контроль	869	0	599	

Значения CELISA отражают относительные единицы флуоресценции (ОЕФ) каждого образца. Значения FACS представляют собой геометрические средние (геом. среднее) относительных интенсивностей флуоресценции каждого образца.

Таблица 4

Последовательности CD3, используемые для иммунизации

CD3d человека	NP_000723.1 (www.uniprot.org/uniprot/P04234) (SEQ ID NO:691)
CD3e человека	(NP_000724.1 (www.uniprot.org/uniprot/P07766) (SEQ ID NO:636)
CD3d яванского макака	XP_001097302 (www.uniprot.org/uniprot/Q95L18) (SEQ ID NO:692)
CD3e яванского макака	CD3e+TCE (www.uniprot.org/uniprot/Q95L15) (SEQ ID NO:693)

### 1.2. Клонирование антител к CD3.

Антитела к CD3 человека получали в OmniRat (OMT, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Последовательности варибельной области (V-области) этих клонов экстрагировали из геномных последовательностей и анализировали. Все полученные последовательности представляли собой или тяжелую цепь, или легкую цепь лямбда человеческого IgG, а последовательности, в особенности LC, демонстрировали высокую гомологию. Выравнивание последовательностей относительно последовательностей зародышевой линии продемонстрировало некоторые мутации в каркасной области (фиг. 1). Последовательности ДНК V-области синтезировали и клонировали в векторы экспрессии млекопитающего, последовательности тяжелой цепи - в вектор человеческого IgG1, а последовательности легкой цепи - в вектор человеческой лямбда. Последовательности показаны в табл. 6 и 7. Семи мкАт были присвоены идентификаторы белка (табл. 5А).

CD3B312 выбирали в качестве наиболее репрезентативного клона, а последовательности тяжелой цепи клонировали в человеческий IgG1 sigma и IgG4 PAA с мутациями S228P, F234A, L235A и назначали идентификаторы белка, как показано в табл. 5В. Их использовали для получения биспецифических антител и для демонстрации функциональности перенаправления Т-клеток посредством цитотоксичности.

Таблица 5А

ID пептида и ID белка для клонов

ID клона	ID пептида HC	ID пептида LC	ID белка
BLW-2B4	CD3H218	CD3L123	CD3B311
BLW-2E6	CD3H219	CD3L124	CD3B312
BLW-3B4	CD3H218	CD3L125	CD3B313
BLX-1F8	CD3H220	CD3L126	CD3B314
BLX-2E9	CD3H221	CD3L124	CD3B315
BLX-3F4	CD3H222	CD3L124	CD3B316
BLX-3G8	CD3H223	CD3L124	CD3B317



	QKSLSLSPGK			
<b>CD3B312</b>	<b>ID пептида HC: CD3H219</b> QVRLQQSGPGLVKPSQTL TCAISGDSVFNNNAASWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVTVKSRITVNPDTSR NQFTLQLTSVTPEDTALYYC ARGYSSSFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSSVTVPSSTLGTQ YICNVNHNKPSNTKVDKVEP KSCDKTHTCPPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVHLQDNLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	(640)	<b>ID пептида LC: CD3L124</b>  QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKVFV SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	(646)
<b>CD3B313</b>	<b>ID пептида HC: CD3H218</b>		<b>ID пептида LC: CD3L125</b>	

(BLW-3B4)	<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFNNNGAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	(638)	<p>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKQVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWWSKRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>	(649)
CD3B314  (BLX-1F8)	<p><b>ID пептида HC: CD3H220</b> QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLKSVTPEDTALYYCSRGYSSSFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	(641)	<p><b>ID пептида LC: CD3L126</b> QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGTYKQVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWWSKRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>	(650)
CD3B315	<b>ID пептида HC: CD3H221</b>		<b>ID пептида LC: CD3L124</b>	



(BLX-3G8)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAISGDSVFNNAAWSWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYYC VRGYSSSFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFELYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	(644)	QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSRDIGTYKFV SWYQQHPDKAPKVLVLY EVNKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRYSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	(648)
-----------	--	-------	--	-------

Таблица 7А

Последовательности VH и VL с изотипом HC и LC 7 моноклональных антител к CD3 из первой панели 9, описанной выше (см. табл. 3)

ID Fab	ID пептида	VH (SEQ ID NO:)	ID пептида	VL (SEQ ID NO:)
CD3B311	CD3H218	qvqlqsgpglvkpsqtlstcai sgdsvfnnaawswirqpspr glewlgertyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycvrgysssfdywggg tlvtvss (651)	CD3L123	qsaltqpasvsgspgqisitctgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev nkrpsgvssrfsksksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggklt vl (658)
CD3B312	CD3H219	qvqlqsgprlvrpsqtlstcai sgdsvfnnaawswirqpspr glewlgertyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycargysssfdywggg tlvtvss (652)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqisitctgtsn igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev skrpsgvssrfsksksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggklt vl (659)
CD3B313	CD3H218	qvqlqsgpglvkpsqtlstcai sgdsvfnnaawswirqpspr glewlgertyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycvrgysssfdywggg tlvtvss (687)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqisitctgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev skrpsgvssrfsksksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggklt vl (688)

CD3B314	CD3H220	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnnaawswirqpsr glewlgtrtyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlksvtp edtalycsrgysssfdywgqg tlvtvss (653)	CD3L126	qsaltqpasvsgspgqsitictgtssd igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsfgsksdntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtkl vl (660)
CD3B315	CD3H221	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnngawswirqpsr glewlgtrtyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalycargysssfdywgqg tlvtvss (654)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitictgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsfgsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtkl vl (659)
CD3B316	CD3H222	qvrlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnnaawswirqpsr glewlgtrtyrskwlydyavtv ksritvnpdtsrnqftlqltsvtp dtalycargysssfdywgqgtl vtvss (655)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitictgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsfgsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtkl vl (659)
CD3B317	CD3H223	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnnaawtwirqpsrg lewlgtrtyrskwlydyavsvk srivnpdtsrnqftlqlksvtp dtalycsrgysssfdywgqgtl vtvss (656)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitictgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsfgsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtkl vl (659)

Все изотипы HC представляли собой hulGI Gln(17). Все изотипы LC представляли собой huLambda 2.

Таблица 7B

Последовательности CDR с изотипом HC и LC 7 моноклональных антител к CD3 из первой панели 9, описанной выше (см. табл. 3)

		CDR (SEQ ID NO: )		
ID FAB	ID пептида	CDR1	CDR2	CDR3
CD3B311	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFDY (664)
	LC CD3L123	TGTSRDIGTYKFVS (667)	EVNKRPS (669)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B312	HC CD3H219	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFDY (664)
	LC	TGTSSNIGTYKFVS	EVSKRPS	CSYAGSGTLL

	CD3L124	(671)	(673)	(670)
CD3B313	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSRDIGTYKFVS (672)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B314	HC CD3H220	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L126	TGTSSDIGTYKFVS (674)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B315	HC CD3H221	NNNGAWS (665)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B316	HC CD3H222	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVTVKS (689)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B317	HC CD3H223	NNNAAWT (666)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)

Последовательности определены по Kabat. Все изоциты HC представляли собой huIgG1\_Glm(17). Все изоциты LC представляли собой huLambda 2.

1.3. Скрининг гибридом в отношении их связывания с очищенными Т-клетками человека и яванского макака.

Был разработан клеточный анализ связывания для оценки способности отдельных супернатантов гибридом крыс к CD3+ Т-лимфоцитам человека (фиг. 2) и яванского макака (фиг. 3). Т-клетки подсчитывали, разбавляли до  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали с 0,5 мкл/мл Live/Dead Fixable Green Dead Cell Stain (Life Technologies, L-2301). Затем клетки разделяли на аликвоты в планшете с U-образным дном (Falcon 353077) по 100 мкл/лунка ( $1 \times 10^5$  клеток/лунка). Планшеты центрифугировали при 300g в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 4,5 мкг/мл, а затем последовательно разбавляли 6 раз при разведениях 1:3 до самой низкой концентрации 0,006 мкг/мл. Положительный контроль мышинового антитела к CD3 (SP34-2, BD Biosciences 551916) и отрицательного изотипического контроля (мышинный IgG1, BD Biosciences 556648) также разводили до 4,5 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к Т-клеткам и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Клетки однократно промывали окрашивающим буфером и добавляли конъюгированные с AF647 вторичные козы антитела к мышинному IgG (Life Technologies, A21235) или конъюгированные с AF647 козы антитела к крысиному IgG (Life Technologies, A21247) в концентрации 10 мкг/мл в 50 мкл в соответствии с соответствующими видами (антикрысиные антитела для образцов гибридомы и антимышиные антитела для контрольных антител). Планшеты инкубировали при 4°C в течение 45 мин и дважды промывали окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера (окрашивающий буфер +1 мМ ЭДТК (Life technologies, AM9260G)+0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)) и считывали на системе Intellicyt (Intellicyt Corp.). Результаты приведены на фиг. 2 и 3.

В других экспериментах очищенные человеческие Т-клетки высевали с плотностью  $1,1 \times 10^5$  клеток/лунка в планшеты с U-образным дном. Планшеты центрифугировали при 300g в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 30 мкг/мл, а затем последовательно разбавляли 11 раз при разведениях 1:3 до самой низкой концентрации 0,00017 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к Т-клеткам и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Клетки однократно промывали окрашивающим буфером и добавляли конъюгированное с Dylight 650 козые вторичное антитело к крысиному IgG (Bethyl, A110-239D5) в концентрации 10 мкг/мл в 50 мкл. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч и дважды промывали окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали в 30 мкл буфера для FACS и



считывали на проточном цитометре Hypercyte (Intellicyt Corp.). Репрезентативные кривые доза-эффект для клонов антитела к CD3, связывающихся с первичными человеческими Т-клетками, показаны на фиг. 5.

Репрезентативные кривые конкурентного связывания с SP34-2 (коммерческое антитело к CD3 человека, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака) показаны на фиг. 6. Результаты начального скрининга представлены в табл. 8. Шесть клонов продемонстрировали положительное связывание, а также конкурируют с SP34-2 за связывание с первичными человеческими Т-клетками.

#### 1.4. Конкурентный анализ с коммерческим антителом к CD3 SP34-2.

Супернатанты гибридом также оценивали на их способность конкурировать с коммерческим антителом к CD3 человека SP34-2, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака. Сначала была построена кривая титрования концентрации флуоресцентно меченного AF488 SP34-2 (BD, 557705), для определения фиксированной концентрации SP34-2 для следующих конкурентных анализов. Вкратце очищенные Т-клетки человека разводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл в PBS. Fc Block (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) добавляли к 5/100 мкл клеток и высевали по 100 мкл/лунка в планшеты с U-образным дном. AF488 SP34-2 и меченный AF488 изотипический контроль (мышинный IgG1 AF488, BD, 400129) последовательно разводили от 50 до 0,049 мкг/мл по схеме разведения 1:2. Планшеты центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. К клеткам добавляли по 50 мкл каждого разведения AF488 SP34-2 и инкубировали при  $4^\circ C$  в течение 1 ч. Планшеты дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G)+0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). На основании кривой доза-эффект для конкурентного анализа была выбрана фиксированная концентрация 2 мкг/мл SP34-2.

Семь гибридом, которые демонстрировали связывание с очищенными Т-клетками, анализировали на предмет конкуренции с SP34-2 в отношении связывания с человеческими Т-клетками (фиг. 4). Контрольные антитела были включены в конкурентный анализ. Немеченные мышинные антитела к CD3 человека, SP34-2 и мышинные антитела к CD3 человека, UCNT1 использовали в качестве положительных контролей, а крысиный IgG и мышинный изотип использовали в качестве отрицательных контролей для AF488-меченных SP34-2. Очищенные человеческие Т-клетки разбавляли до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в PBS. К клеткам добавляли Fc Block в концентрации 5/100 мкл клеток (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) и Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain в концентрации 0,5 мкл на мл клеток (Life Technologies L10120) и инкубировали в течение 15 мин при  $4^\circ C$ . Затем аликвоты по 10 клеток на лунку ( $1 \times 10^5$  клеток/лунку) помещали в 96-луночный планшет с U-образным дном (Falcon 353077). Планшеты центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом и контрольные антитела разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) в  $2 \times$  желаемой конечной концентрации. 35 мкл  $2 \times$  супернатантов гибридом и контрольных антител смешивали с 35 мкл  $2 \times$  AF488 SP34-2 (4 мкг/мл) с получением желаемой концентрации  $1 \times$  супернатантов гибридом, контрольных антител в концентрации  $1 \times$  и 2 мкг/мл AF488 SP34-2. Супернатанты гибридом и контрольные антитела анализировали с использованием титрования по 7 точкам в диапазоне концентраций. Супернатанты гибридом анализировали от 200 мкг/мл до 0,08 мкг/мл, а контрольные антитела анализировали от 100 до 0,04 мкг/мл. 50 мкл супернатантов гибридом в концентрации  $1 \times$  или контрольных антител в концентрации  $1 \times$  с 2 мкг/мл AF488 SP34-2 добавляли к Т-клеткам и инкубировали при  $4^\circ C$  в течение 2 ч. Планшеты дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G)+0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). Репрезентативные кривые конкурентного связывания с SP34-2 (коммерческое антитело к CD3 человека, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака) показаны на фиг. 4 и 6. Результаты начального скрининга представлены в табл. 8. Шесть клонов продемонстрировали положительное связывание, а также конкурировали с SP34-2 за связывание с первичными Т-клетками человека.

Как показано на фиг. 4, семь антител, которые конкурировали с SP34-2, имели аналогичные кривые. Смещение кривых вправо относительно контрольного SP34-2 указывает на более слабую аффинность связывания. Как и ожидалось, изотипический контрольный крысиный IgG не конкурировал с SP34-2.

Таблица 8

Сводные данные по связыванию антитела к CD3 с первичными Т-клетками человека

Клон Ат	Связывает Т-клетки человека	Конкурирует с SP34-2
BLW-2B4	+	+
BLW-2E6	+	+
BLW-3B4	+	+
BLX-1F8	+	+
BLX-2E9	+	+
BLX-3F4	+	+
BLX-3G8	+	+
BLX-1G10	-	-
BLX-3H6	-	-
BLX-4E5	+	+
BLX-5H7	+	+
BLX-8B4	+	+
BLX-8B6	+	+
BLX-8G8	+	+
BLW-1E3	+	+
BLW-1F1	+	-
BLW-2C4	-	-
BLW-2C11	-	-
BLW-2F9	-	-
BLW-3B5	-	-
BLW-3H5	-	-

Клоны к CD3, BLX-4E5, BLX-5H7, BLX-8B4, BLX-8B6, BLX-8G8 и BLW-1E3 оказались положительными в отношении связывания с Т-клетками человека и конкурировали со связыванием SP34-2.

1.5. Скрининг отобранных соединений из гибридом в отношении Т-клеточной активации, измеренной по повышению экспрессии CD69.

Для определения способности отобранных соединений из гибридом активировать Т-клетки использовали первичный анализ на основе Т-клеток человека и яванского макака. Этого достигали путем нанесения антител на планшет для имитации перекрестного эффекта активации TCR. Известно, что при активации Т-клетки усиливают поверхностную экспрессию белка CD69. Эксперимент проводили путем нанесения 50 мкл препарата антител с концентрацией 10 мкг/мл с неизвестными образцами или контролями (положительный контроль: собственной разработки, Окт-3 B1SB264.002, BD Bioscience SP-34-2 №551916; отрицательный контроль: анти-CD20, разработанный самостоятельно, B1SB266.004) на 96-луночный планшет (Costar № 3361). Клетки инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день планшеты дважды промывали PBS. Замороженные первичные Т-клетки (человеческие, полученные от компании Biological Specialties или Nemascare; яванского макака, полученные от компании Worldwide Primates), размораживали, оценивали на жизнеспособность и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде RPMI 1640 (Gibco № 11875 с 10% HI FBS (Gibco №10062)). 100 мкл клеток добавляли в планшет и инкубировали в течение ночи (приблизительно 16 ч) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день планшеты центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 мин для осаждения клеток и отделяли супернатанты. Клетки однократно промывали в PBS и центрифугировали так же, как и ранее. В каждую лунку добавляли по 10 мкл 2,5% раствора Live/Dead Green Fixable Dye (Life Technologies, № L23101) в PBS и инкубировали при комнатной температуре и в темноте в течение 10 мин. Затем добавляли 50 мкл 1% раствора анти-CD69 AF488 (Biolegend, № 310916, партия № B125271) в буфере для FACS (BD Biosciences, № 554657) и инкубировали планшеты в течение 45 мин при 4°C. Планшеты дважды промывали путем осаждения клеток, как прежде, и удаления супернатанта, и ресуспендирования в 150 мкл буфера для FACS. После последней промывки клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS и считывали на FACS Canto. Как видно на фиг. 20, положительные контроли сOkt3 и SP34-2 индуцировали повышение экспрессии CD69 на Т-клетках человека, о чем свидетельствует измеренная средняя интенсивность флуоресценции при окрашивании анти-CD69. Только SP34-2 индуцировало экспрессию CD69 в Т-клетках яванского макака, так как оно связывается с областью последовательности CD3, которая является консервативной у обезьяны и человека. Клон антитела к CD3

ОКТЗ не связывался с CD3 яванского макака и не индуцировал повышение экспрессии CD69. Отрицательный контроль как в Т-клетках человека, так и в Т-клетках яванского макака представлял собой антитело к CD20, который не экспрессируется на Т-клетках. Из клонов гибридом, которые были протестированы в отношении активации Т-клеток, несколько индуцировали экспрессию CD69 в той же степени, что и положительный контроль, а именно 2B4, 2E6, 3B4, 1F8, 2E9, 3F4, 3G8, 4E5, 5H7, 8B4, 8G8 и 1F1. Большинство из них также связывало и активировало Т-клетки яванского макака, за исключением 5H7, 8B4 и 8G8.

#### 1.6. Конструирование каркаса BLW-2E6.

Клоны продемонстрировали высокую гомологию и несли мутации каркаса относительно последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (фиг. 1А и 1В). Клон 2E6 был выбран для модификации стандартной последовательности каркаса. Все 6 мутаций в HC и 7 мутаций в LC подвергали обратной мутации до последовательности человеческой зародышевой линии, или по отдельности, или в комбинации (табл. 9). Мутировавшие последовательности ДНК V-области были синтезированы и клонированы в те же векторы экспрессии млекопитающих, что и их исходные конструируемые. Конструкты HC и LC соединяли посредством матричного формата для получения белков, несущих отдельные или комбинаторные мутации, и тестировали активность белка. V48 на LC не может быть изменен обратно до последовательности зародышевой линии. Все другие обратные мутации не имели решающего значения, но до некоторой степени снижали активность.

Таблица 9

Варианты каркаса BLW-2E6

Обратная мутация в тяжелой цепи до человеческой зародышевой линии	ID пептида
WT	CD3H219
R10G	CD3H225
R13K	CD3H226
V73I	CD3H227
R79K	CD3H228
T83S	CD3H229
L96V	CD3H230
R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V	CD3H231
Обратная мутация в легкой цепи до человеческой зародышевой линии	ID пептида
WT	CD3L124
D43G	CD3L128
V48L	CD3L129
L49M	CD3L130
L50I	CD3L131
S62N	CD3L132
Q85E	CD3L133
H89Y	CD3L134
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E	CD3L135
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L137
D43G/V48L/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L136
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y/C91V	CD3L197

Мутации в каркасе были выполнены для одного клона гибридомы, BLW-2E6, в результате чего получили 80 мутантных клонов, некоторые из которых указаны в табл. 10. 80 мутантных клонов анализировали на связывание с первичными Т-клетками человека (фиг. 7 и 8). Т-клетки подсчитывали, разбавляли до  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали с 5 мкл Fc Block (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) на 100 мкл клеток и 0,5 мкл на мл Live/Dead Fixable Green Dead Cell Stain (Life Technologies, L-2301) на 100 мкл клеток. Затем клетки разделяли на аликвоты в 96-луночном планшете с U-образным дном (Falcon 353077) по 100 мкл/луночка ( $1 \times 10^5$  клеток/луночка). Планшеты центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно временно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 7,5, 1,5, 0,3 и 0,06 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к Т-клеткам и инкубировали при  $4^\circ C$  в течение 1 ч. Клетки промывали один раз окрашивающим буфером и к клеткам добавляли 50 мкл меченого AF647 вторичного козьего

антитела к F(ab')<sub>2</sub> IgG в концентрации 5 мкг/мл (Jackson ImmunoResearch, кат. 109-605-097). Планшеты инкубировали при 4°C в течение 45 мин, и дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 мМ ЭДТК (Life technologies, AM9260G)+0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). Результаты демонстрируют, что изменение LC в положении 48 устраняет связывание, так что мутация не переносилась. Небольшое снижение связывания наблюдали в HC со всеми положениями, возвращенными до зародышевой линии (CD3H231).

#### 1.7. Сканирование C91 LC BLW-2E6.

Клон 2E6 и его производные экспрессировались слабо, и наблюдалась агрегация белка. Один остаток, C91 легкой цепи, предположительно имел риск посттрансляционной модификации (ПТМ) и его подвергали мутации до всех других возможных аминокислот для улучшения стабильности белка (табл. 10). Мутировавшие последовательности ДНК V-области были синтезированы и клонированы в тот же вектор экспрессии человеческой лямбда, что и их исходный конструкт. Результаты НИР продемонстрировали, что изменение валина или лейцина в положении 91 не приводило к резкому изменению аффинности связывания. Это изменение также включалось в последовательность дикого типа и адаптацию каркаса, что приводило к получению антител CD3B376 (CD3H219/CD3L150) и CD3B450 (CD3H231/CD3L197). CD3B376 и CD3B450 клонировали как IgG4PAA (IgG4 с мутациями S228P, F234A, L235A).

Информация о последовательности для CD3B376 представлена ниже.

#### Аминокислотная последовательность HC CD3H219 (SEQ ID NO:640):

QVQLQQSGPRLVLRPSQTLTSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK  
WLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGLTV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPS  
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVD  
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

#### Нуклеотидная последовательность HC CD3H219 (SEQ ID NO: 712)

caggtgcagctgcagcagctctgcccctagactcgtgcccctccagacctgctctgacctgcccctccgactcc  
gtgttcaacaacaacgcgcctgctcctgatccggcagaccctctagagcctggaatggctggccggacctactaccggccaag  
tgctgtacgactacgcccgtgctcctgaagtcccggatcaccgtgaacctgacacctcccgaaccagttcacctgcagctgaactccg  
tgacctcagggacaccgccctgtactactgcgccagaggctactcctcctcctcctgactattggggccaggccacctcgtgacctgctc  
tct

#### Аминокислотная последовательность LC CD3L150 (SEQ ID NO:676):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVVLLYEVSKRPSGV  
SSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSV  
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAA  
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

#### Нуклеотидная последовательность LC CD3L150 (SEQ ID NO: 713)

cagctgctctgaccagcctgcccctgctgctcctccggccagtcaccatcaccatcagctgaccggcactcctccaacat  
cggcacctacaagttcgtgctcctggtatcagcagaccccgacaagcccccaagtgctgctgtacgaggtgccaagcggcctctgg  
cgtgctcctccagattcctccggctccaagctggcaacaccgctcctgaccatcagcggactgcaggctgaggaccagggcactacca  
ctgtgtgctcctacgctgctcctggcacctcgtgttggcggaggaccaagctgacctgctg

#### Аминокислотная последовательность VH CD3H219 (SEQ ID NO:652):

qvqlqqsgprlvrrpsqtlslcaisgdsvfnnaawswirqsprrglewlgertyrskwlydyavsvksritvnpdtsmqftlqlnsvtp  
edtalyycargysssfdywgqglvtvss

#### Аминокислотная последовательность VL CD3L150 (SEQ ID NO:661):

qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssnigtykfsvswyqqhpdkapkvlllyevskrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedqadyhc  
Vsyagsgtllfgggtklvtl

HCDR1 CD3H219 (SEQ ID NO:662): NNNAAWS

HCDR2 of CD3H219 (SEQ ID NO:663): RTYYRSKWLYDYAVSVKS

HCDR3 of CD3H219 (SEQ ID NO:664): GYSSFDY

LCDR1 of CD3L150 (SEQ ID NO:671): TGTSSNIGTYKFVS

LCDR2 of CD3L150 (SEQ ID NO:673): EVSKRPS

LCDR3 of CD3L150 (SEQ ID NO:690): VSYAGSGTLL

Информация о последовательности для CD3B450 представлена ниже.

Аминокислотная последовательность HC CD3H231 (SEQ ID NO:675):

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTY  
YRSKWLYDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGYSSFDYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP  
EAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY  
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYS  
KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Нуклеотидная последовательность HC CD3H231 (SEQ ID NO: 714):

cagggtcagctgcagcagagcggccccggcctggtcaagcccagccagaccctgagcctgacctgcgccatcagcggcga  
cagcgtgtcaacaacaacgccgctgtcctggatccgccagagccccagccggcctggagtgctggcgccacactaccgca  
gcaagtggctgtacgactacgccgtgtccgtgaagtcgccatcacatcaaccccagaccagcaagaaccagttctcctgcagctga  
acagcgtgacccccgaggacaccgctgtactactcgccccggcctacagcagcagcttcgactaggggccagggcaccctggt  
caccgtgtccagc

Аминокислотная последовательность LC CD3L197 (SEQ ID NO:677):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMYEVSKR  
PSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKA  
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN  
KYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Нуклеотидная последовательность LC CD3L197 (SEQ ID NO: 715):

Cagtctgctctgaccagcctgcctcctgctgtgctctcccggccagtcacatcacatcagctgtaccggcactcctccaaca  
tcggcacctacaagtctgtctctgtatcagcagccccggcaagccccaaagtgatgatctacgaggtgtccaagcggcctcgg  
gcgtgtccaacagattctccgctccaagtcggcaacaccgctcctgacaatcagcggactgcagcggcagggacgagggcgactac  
tactgtgtcctacgccgctctggcaccctgctgttggcgcggaacaagctgaccgtgctg

Аминокислотная последовательность VH CD3H231 (SEQ ID NO:657):

qvqlqsgpplvkpsqtlstcaisgdsvfnnaawswirqsparglewlgtrtyrskwlydyavsvksritinpdtsknqfs  
lqlnsvtpedtavyycargysssfdywqgtltvss

Аминокислотная последовательность VL CD3L197 (SEQ ID NO:678):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMYEVSKR  
PSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

HCDR1 CD3H231 (SEQ ID NO:662): NNNAAWS

HCDR2 CD3H231 (SEQ ID NO:663): RTYYRSKWLYDYAVSVKS

HCDR3 CD3H231 (SEQ ID NO:664): GYSSFDY

LCDR1 CD3L197 (SEQ ID NO:671): TGTSSNIGTYKFVS

LCDR2 CD3L197 (SEQ ID NO:673): EVSKRPS

LCDR3 CD3L197 (SEQ ID NO:690): VSYAGSGTLL

Таблица 10

## Сконструированные варианты LC BLW-2E6 путем сканирования C91

Сканирование C91	ID пептида
CD3 2E6 LC	CD3L124
CD3 2E6 LC, C91S	CD3L146
CD3 2E6 LC, C91G	CD3L147
CD3 2E6 LC, C91E	CD3L148
CD3 2E6 LC, C91D	CD3L149
CD3 2E6 LC, C91V	CD3L150
CD3 2E6 LC, C91A	CD3L151
CD3 2E6 LC, C91R	CD3L152
CD3 2E6 LC, C91K	CD3L153
CD3 2E6 LC, C91N	CD3L154
CD3 2E6 LC, C91M	CD3L155
CD3 2E6 LC, C91I	CD3L156
CD3 2E6 LC, C91T	CD3L157
CD3 2E6 LC, C91W	CD3L158
CD3 2E6 LC, C91Y	CD3L159
CD3 2E6 LC, C91L	CD3L160
CD3 2E6 LC, C91F	CD3L161
CD3 2E6 LC, C91Q	CD3L162
CD3 2E6 LC, C91H	CD3L163
CD3 2E6 LC, C91P	CD3L164

## 1.8. Связывание мкАт к CD3 BLW-2E6 с конструктором hCD3ε при помощи ППП ProteOn.

Связывание мкАт к CD3 BLW-2E6 с точечными мутациями в легкой и/или тяжелой цепях с рекомбинантным пептидом CD3ε(1-27) человека с C-концевым гибридным белком Tencon25 (продукция Janssen, называемая hCD3ε(1-27)-Tn25) измеряли при помощи ППП ProteOn (Bio-Rad). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-098) напрямую иммобилизованы по амино-группе в концентрации 30 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 5,0, во всех 6 вертикально ориентированных лигандных каналах на чипе GLC Sensor (Bio-Rad, кат. № 176-5011) при скорости потока 30 мкл/мин в PBS, содержащем 0,005% Tween-20. Значения плотности иммобилизации в среднем составляли около 6000 единиц ответа (RU) с менее чем 5% разбросом между разными каналами. Пять различных мкАт захватывали на поверхности антитела к человеческому Fc IgG в концентрации 1,5 мкг/мл (1000~1250 RU) в вертикальной ориентации лиганда, с отсутствием 6-го лигандного канала в качестве контроля поверхности лиганда. hCD3ε(1-27)-Tn25 при концентрации 1 мкМ в серии 3-кратных разведений из 5 концентраций применяли в качестве аналита для связывания с захваченными мкАт в горизонтальной ориентации. 6-й Образец буфера также вводили для контроля диссоциации захваченного мкАт и стабильности базовой линии. Фазу диссоциации для всех концентраций hCD3ε(1-27)-Tn25 отслеживали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 мин. Поверхность связывания регенерировали для следующего цикла взаимодействия с использованием 18-секундного импульса 0,8% фосфорной кислоты для удаления антигена и связанного мкАт. Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) сигналов между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) сигналов канала буфера для коррекции смещения базовой линии из-за диссоциации со временем захваченного мкАт с поверхности. Обработанные данные для всех концентраций для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения оценок констант кинетики ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и аффинности ( $K_D$ ). Результаты представлены на фиг. 11.

Сводные данные по кинетике/аффинности  
связывания вариантов BLW-2E6 с hCD3ε(1-27)-Tn25 (N=1)

ID белка по а.к.	Тяжелая цепь	Легкая цепь	ka (1/M*с)	kd (1/с)	KD (нМ)	Мутация(ии) в НС	Мутация(ии) в LC
СЗВ312	CD3H219	CD3L124	9.08E+04	1.87E-03	20,6	Дикий тип	Дикий тип
CD3В376	CD3H219	CD3L150	1.02E+05	2.37E-03	23,3	Дикий тип	С91V
Н/П	CD3H219	CD3L160	9.84E+04	4.05E-03	41,1	Дикий тип	С91L
Н/П	CD3H219	CD3L137	6.13E+04	2.02E-03	32,9	Дикий тип	D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y
CD3В334	CD3H231	CD3L137	6.96E+04	5.54E-03	79,6	R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V	D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y

Н/П=не присвоен.

1.9. Связывание моноклональных антител к CD3 с Т-клетками человека.

Аффинность связывания CD3В376 и CD3В450 *in vitro* с Т-клетками человека определяли с помощью проточной цитометрии после скрещивания с антигенспецифическим целевым плечом. Проводили предварительное исследование человеческих Т-клеток для определения константы насыщения связывания меченой молекулы к CD3 (K<sub>d</sub>T). Фиксированную концентрацию меченого соединения ([T]) затем использовали в анализе конкурентного связывания с титрованными концентрациями исследуемых мкАт. Значение IC50 (концентрация, при которой достигается 50% ингибирования) для исследуемой молекулы использовали для определения аффинности связывания (K<sub>d</sub>) по следующей формуле:  $K_d = IC50 / (1 + ([T] / K_d T))$ . Для определения константы насыщения (K<sub>d</sub>T) меченого соединения, имеющегося в продаже антитела к CD3 AlexaFluor488 SP34-2 (BioScience, № 557705), использовали пять доноров-людей (данные не показаны).

Определение константы насыщения связывания меченого соединения (K<sub>d</sub>T) Способы. Пан-Т-клетки человека подвергали криоконсервации в азотных емкостях до применения. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, подсчитывали (с указанием жизнеспособности) и ресуспендировали при  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Краситель Far Red Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen № L34974) (50 мкл DMSO во флакон), добавляли по 1 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток; и блокатор FcR (Miltenyi Biotec, №130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на  $0,5 \times 10^6$  клеток) добавляли к клеткам в течение 10 мин каждый. Клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунку и промывали. К Т-клеткам добавляли возрастающие концентрации антител к CD3 AlexaFluor488 SP-34 в течение 2 ч при 4°C. Клетки промывали для удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 мин, промывали и ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, содержащем 1 мМ ЭДТК.

Для измерения связывания применяли проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции Т-клеток, затем по синглетах клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1).

Полученные средние значения интенсивности флуоресценции наносили на график в виде зависимости от концентрации молекулы антитела и анализировали с помощью программного обеспечения Prism в анализе связывания с одним сайтом (общее связывание) (фиг. 9). Программное обеспечение вычисляет соответствующее значение K<sub>d</sub>, которое описывает связывание молекулы антитела с рецептором (CD3 на пан Т-клетках человека), которое подчиняется закону действия массы. Формула выглядит следующим образом:

$$Y = (B_{\max} \times X) / (K_d + X),$$

где B<sub>max</sub> представляет собой максимальное связывание;

K<sub>d</sub> представляет собой концентрацию лиганда, необходимую для достижения полумаксимального связывания.

Результаты. Для каждого донора получали значения K<sub>d</sub> и получали среднее значение. Константа насыщения связывания (K<sub>d</sub>T) для Т-клеток человека составила  $5,6 \pm 1,0$  нМ (n=4) и была использована в ранее упомянутой формуле для определения аффинности связывания K<sub>d</sub>.

Определение аффинности связывания мкАт к CD3 с помощью конкурентного анализа.

Способы. Исследования конкурентного связывания проводили с использованием двухвалентных антител к CD3.

Двухвалентные антитела к CD3: CD3В376 и CD3В450 (фиг. 10).

Для определения аффинности связывания исследуемых мкАт использовали пан Т-клетки человека.

Используемое меченое соединение представляло собой коммерчески доступное конъюгированное с AlexaFluor488 антитело к CD3 SP-34 (BioScience, № 557705), и для этого меченого вещества выше описана константа насыщения связывания.

Т-клетки подвергали криоконсервации в азотных емкостях до применения. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, подсчитывали с указанием жизнеспособности и ресуспендировали при  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Краситель Far Red Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen № L34974) (50 мкл DMSO во флакон), добавляли по 1 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток; и блокатор FcR (Miltenyi Biotec, №130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на  $0,5 \times 10^6$  клеток) добавляли к клеткам в течение 10 мин каждый. Клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунку и промывали.

мкАт (и изотипический контроль) последовательно разводили 1:2 с начальной концентрации 1000 или 200 мкг/мл ( $2 \times$ ) и фиксированной концентрации меченого соединения (5 мкг/мл;  $2 \times$ ) смешивали с получением  $1 \times$  концентраций. Таким образом, конечная (1X) концентрация меченого соединения составляла  $2,5 \text{ мкг/мл} = 16,6 \text{ нМ}$ . Смесь добавляли к Т-клеткам в течение 2 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Клетки впоследствии промывали для удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 мин, промывали и ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, содержащем 1 мМ ЭДТК.

Для измерения связывания применяли проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции Т-клеток, затем по синглетам клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1). Полученные средние значения интенсивности флуоресценции были нанесены на график в виде зависимости логарифмической концентрации молекулы антитела (преобразованной в нМ) и проанализированы с использованием программного обеспечения Prism в отношении сигмоидальной кривой доза-ответ (переменный угловой коэффициент), из которой получены значения  $EC_{50}/IC_{50}$  (в нМ). Аффинность связывания ( $K_d$ ) получали с использованием следующей формулы:

$$K_d = IC_{50} / (1 + ([T]/K_dT)),$$

где  $K_d$  представляет собой аффинность конкурента (немеченая молекула);

$IC_{50}$  в нМ исследуемого соединения;

$[T]$  представляет собой концентрацию меченого соединения (16,6 нМ);

$K_dT$  представляет собой  $K_d$  меченого соединения, определяемого по связыванию с насыщением (5,6 нМ для человека).

Получение моноклональных и биспецифических антител.

Биспецифические антитела к CD3 по настоящему изобретению можно создавать посредством контролируемого обмена Fab-плечами (FAE), как описано в Labrijn et al., 2013, PNAS, vol. 110(13):5145-5150; публикации PCT WO 2011/131746; или в Labrijn et al., 2014, Nat. Protoc., 9(10):2450-63. Вкратце в этом способе *in vitro* предложены два полноразмерных исходных двухвалентных антитела, каждое из которых содержит мутацию в области CH3 антитела, способствующую образованию гетеродимера, что приводит к получению биспецифических антител, содержащих полуплечо, из каждого исходного антитела. Мутации, которые могут использоваться для содействия образованию гетеродимеров, представляют собой F405L в одном исходном антителе и R409K в другом исходном антителе для антител IgG1 или F405L и K409R в одном исходном антителе при сохранении CH3 дикого типа для антител IgG4.

Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях НЕК под контролем промоторов CMV.

Исходные антитела очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером с 100 мМ NaAc, pH 3,5, а также нейтрализующим буфером с 2 М Tris pH 7,5 и 150 мМ NaCl. мкАт обессоливали с использованием колонки PD10 (Sephadex G25M) и диализовали в буфере D-PBS при pH 7,2.

После очистки исходные антитела смешивали в восстанавливающих условиях в 75 мМ цистеамин-НСl и инкубировали при  $31^\circ\text{C}$  в течение 4 ч. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, где заданное количество целевого исходного антитела (например, 10 мг или  $\sim 71,8$  наномолей) было объединено с антителом к CD3 (например,  $\sim 67,8$  наномолей), при этом целевое исходное антитело было добавлено при 6% избытке антитела к CD3. Затем продукты рекомбинации диализовали против PBS для удаления восстановителя. Реакции с биспецифическим антителом выполняли с избытком целевого исходного антитела (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к CD3, оставшегося после рекомбинации. После частичного восстановления исходных мкАт восстановитель удаляли посредством диализа в течение ночи в PBS.

Результаты. На фиг. 10 показаны кривые ингибирования для двухвалентных и одновалентных конструкторов к CD3, CD3B376 и CD3B450, конкурирующих за связывание с меченым антителом к CD3 AlexaFluor488 SP-34. Возрастающие концентрации исследуемых антител к CD3 снижали связывание меченого AlexaFluor488 антитела, таким образом снижая среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ). Были получены значения  $IC_{50}$ , и с помощью вышеупомянутой формулы были рассчитаны аффинности  $K_d$  и сведены в табл. 12.



Сайт связывания CD3B376 был плотнее, чем CD3B450 как в двухвалентной, так и в одновалентной форме.

Таблица 12

Значения IC50 и аффинности  $K_d$  для двухвалентных и одновалентных конструкторов CD3B376 и CD3B450

Конструкт	анти-CD3	IC50 (нМ)	$K_d$ (нМ)
Двухвалентный	CD3B376	29	7,3
	CD3B450	60	15
Одновалентный конструктор	CD3B376	409	103
	CD3B450	1011	254

#### 1.10. Конформационная стабильность моноклональных антител к CD3.

Конформационная стабильность антител к CD3 CD3B376, CD3B389 (версия IgG1 от Sigma CD3B376; тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 729; легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 676), CD3B450 и CD3B467 (версия IgG1 от Sigma CD3B450; тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 728; легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 677) определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Среднюю точку теплового перехода,  $T_m$ , определяли по профилям тепловой денатурации каждого из АТ-кандидатов. На фиг. 12А-12Е показаны профили тепловой денатурации антител к CD3 в PBS. В табл. 13 приведена сводная информация по  $T_m$  и значениям энтальпии ( $\Delta H$ ) теплового разворачивания антител к CD3 при определении с помощью ДСК.

Результаты. ДСК демонстрируют, что все антитела к CD3 CD3B376, CD3B389, CD3B450 и CD3B467 имеют свернутые домены. На основании начала разворачивания относительная стабильность каждого антитела была следующей: CD3B389 < CD3B467 < CD3B376 < CD3B450. Молекулы антител к CD3, протестированные с помощью ДСК, продемонстрировали некоторые различия в их термостабильности. Молекула CD3B376 (IgG4 PAA) демонстрировала три частично неразрешенных перехода при 59,7, 62,4 и 69,2°C с общей энтальпией разворачивания 417,6 ккал/моль, тогда как молекула CD3B450 (IgG4 PAA) демонстрировала два неразрешенных перехода при 62,5 и 66,3°C с общей энтальпией разворачивания 545,1 ккал/моль. Молекула CD3B389 (IgG1sigma) демонстрировала четыре перехода при 54,6, 58,2, 73,1 и 77,1°C с общей энтальпией разворачивания 401,7 ккал/моль, тогда как молекула CD3B467 (IgG1sigma) демонстрировала четыре перехода при 56,3, 59,6, 66,5 и 75,6°C с общей энтальпией разворачивания 406,2 ккал/моль.

Таблица 13

Сводные данные по тепловому переходу для антител к CD3 в PBS

	CD3B376		CD3B450		CD3B389		CD3B467	
	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:	НС: SEQ ID NO:
	640	675	729	728				
	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:	LC: SEQ ID NO:
	676	677	676	677				
	Средн. значение	Ошибка	Средн. значение	Ошибка	Средн. значение	Ошибка	Средн. значение	Ошибка
$T_{m1}$ (°C)	59,7	0,1	62,5	0,9	54,6	0,1	56,3	0,1
$\Delta H_1$ (ккал/моль)	151900,0	4200,0	158175,0	64025,0	166150,0	2450,0	98160,0	17840,0
$T_{m2}$ (°C)	62,4	0,1	66,3	0,2	58,2	0,1	59,6	0,0
$\Delta H_2$ (ккал/моль)	202200,0	4300,0	386900,0	71000,0	62050,0	1290,0	72900,0	370,0
$T_{m3}$ (°C)	69,2	0,0	Н/д	Н/д	73,5	0,1	66,5	0,0
$\Delta H_3$ (ккал/моль)	63450,0	2080,0	Н/д	Н/д	101900,0	1600,0	92785,0	6785,0
$T_{m4}$ (°C)	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	77,1	0,0	75,6	0,1
$\Delta H_4$ (ккал/моль)	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	71560,0	2500,0	142400,0	4800,0
Общее $\Delta H$	601000,0	Н/д	545075,0	Н/д	401660,0	Н/д	406245,0	Н/д

Значения представляют собой средние по результатам повторных измерений. Информация о последовательности представлена для пептидов НС и LC (SEQ ID NO в скобках).

Два антитела IgG1 демонстрируют более низкую стабильность по сравнению с соответствующими антителами IgG4 PAA (при сравнении молекул с одними и теми же переменными доменами) с  $T_m$

первого перехода ниже на 5-6°C (фиг. 13А и 13В и табл. 13).

#### 1.11. Кристаллическая структура Fab CD3B334 в комплексе с N-концевым пептидом CD3е.

мкАт к CD3 CD3B334 (CD3H231/CD3L137) модифицировали для повышения индекса "человечности" путем замены ряда каркасных остатков в антителе остатками из человеческой зародышевой линии. В результате этой процедуры было получено антитело CD3B334 со следующими мутациями: D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y в VL по сравнению с исходной VL CD3L124 и R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V в VH по сравнению с исходной VH CD3H219. Меченный гистицином Fab-фрагмент CD3B334 экспрессировали в клетках НЕК 293Ехр1 и очищали с использованием аффинной и эксклюзионной хроматографии. N-концевой 9-мерный пептид человеческого CD3е синтезировали на пептиде New England (партия V1108-19/21) и смешивали с Fab в молярном соотношении 10:1 (избыток пептида). Комплекс кристаллизовали методом диффузией паров из раствора, содержащего 4 М натрий формиата в 0,1 М Трис, рН 8,5. Указанные кристаллы имеют орторомбическую пространственную группу P212121 с размерами элементарной ячейки 66,5×69,4×100,4 Å и одной молекулой комплекса в асимметричной единице. Структуру комплекса определяли с разрешением 1,8 Å методом молекулярного замещения с использованием кристаллической структуры Fab в качестве поисковой модели.

CD3B334 связывал остатки 1-6 CD3е. N-концевой Gln пептида находился в форме пироглутамата и в гидрофобной среде между F107 HCDR3 и L99 LCDR3. Два остатка аргинина, R52 и R56, из HCDR2, взаимодействовали с электростатическими взаимодействиями с кислыми остатками CD3. Всего, 16 остатков образовывали паратоп CD3B334. Остатки всех CDR, за исключением LCDR2, находились в непосредственном контакте (расстояние в пределах 4 Å) с пептидом CD3 (см. фиг. 18).

### 2. Антитела к PSMA.

#### 2.1. Создание клеточных линий PSMA.

Векторы экспрессии, представляющие полноразмерный PSMA шимпанзе (H2Q3K5\_PANTR, SEQ ID NO: 49) или полноразмерный PSMA яванского макака (EHH56646.1, SEQ ID NO: 50), были созданы для применения в качестве инструментов скрининга при оценке лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Векторы временно трансфицировали в клетки НЕК293F в суспензии с использованием стандартных способов. Трансфицированные суспензионные клетки 293F помещали в среду роста с сывороткой, чтобы они стали прикрепленными, и отбирали для стабильной интеграции плазмиды. Популяции отдельных клеток были отобраны путем серийных разведений, и экспрессия поверхностного рецептора PSMA была количественно определена с помощью FACS с использованием аффинно очищенного кроличьего поликлонального антитела (антитело PSMA (Центр) (каталог № OAAB02483, Aviva Systems Biology) в качестве первичного антитела с конъюгированным с R-PE антикроличьим вторичным антителом (каталожный № 111-116-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и кроличьим поликлональным IgG (каталожный № SC-532, Santa Cruz Biotechnology) в качестве изотипического контроля).

Для отбора PSMA-положительных клеток создавали клеточные линии, экспрессирующие человеческий PSMA, с применением лентивируса (Genecoreia, кат. № EX-G0050-Lv105-10), содержащего полноразмерный PSMA человека (FOLH1\_HUMAN, SEQ ID NO: 51) и пурамицин. Клетки НЕК293F (ATCC), отрицательные по PSMA, трансдуцировали лентивирусными частицами для сверхэкспрессии PSMA человека. После трансдукции клетки, положительно экспрессирующие PSMA и маркер устойчивости, отбирали обработкой объединенных клеток, выращивали в среде DMEM+10% HI FBS (Life Technologies) и дополняли различными концентрациями пурамицина (Life Technologies).

Кроме полученных с помощью НЕК линий клеток, для анализов методом фагового пэннинга, и анализов связывания, и клеточной токсичности использовали несколько коммерческих линий клеток. Клетки LNCaP клона FGC (ATCC кат. № CRL-1740) представляют собой коммерчески доступные линии клеток рака предстательной железы человека. Клетки C4-2B были первоначально созданы в MD Anderson, и получены из LNCaP FGC, выращенных *in vivo* и метастазирующих в костный мозг (Thalmann et al., 1994, Cancer Research, 54, 2577-81).

#### 2.2. Получение растворимого белка ВКД PSMA.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA шимпанзе (ВКД PSMA шимпанзе, SEQ ID NO: 52) создавали для пэннинга и оценки лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методики молекулярной биологии. Фрагмент гена ВКД PSMA шимпанзе (аминокислоты 44-750 из SEQ ID NO: 49) с N-концевой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO: 594), N-концевую авидиновую метку (SEQ ID NO: 595) и 6-гистициновыми метками (SEQ ID NO: 596) клонировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии и временно экспрессировали в клетки 293Ехр1 (Invitrogen). кДНК получали с использованием методов генного синтеза (патент США № 6670127; патент США № 6,521,427). Супернатанты собирали и очищали путем центрифугирования. Белки очищали с использованием двухэтапного способа очистки: 1) очистка IMAC с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, GE Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко,

кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ  $ZnCl_2$  для стабилизации димеризации PSMA. Фракции, содержащие интересующий белок, объединяли и определяли концентрацию белка посредством A280. Этот материал использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG8.

ВКД PSMA шимпанзе также биотинилировали для пэннинга. Плазмиду BirA, которую котрансфицировали в клетки млекопитающих в биотинилированные белки, содержащие авидиновую метку, получали самостоятельно. Кодировующую область BirA (SEQ ID NO: 597) сливали с сигнальным пептидом из тяжелой цепи мышиного IgG (SEQ ID NO: 598) и сигналом удерживания ЭР (KDEL (SEQ ID NO: 716)) добавляли к С-концу для получения плазмиды BirA (SEQ ID NO: 599). Сконструированный ген клонировали в вектор экспрессии под контролем промотора CMV. Для получения биотинилированного антигена PSMA плазмидную ДНК PSMA добавляли в 4-кратном избытке (мас./мас.) к плазмиде BirA в смесь для трансфекции.

Биотинилирование белка ВКД PSMA шимпанзе проводили с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструкции экспрессии BirA, и полученный секретированный белок очищали с применением двухэтапного процесса очистки: 1) очистка IMAC с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, GE Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко, кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ  $ZnCl_2$  для стабилизации димеризации PSMA. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA (ВКД PSMA яванского макака, SEQ ID NO: 53), соответствующий аминокислотам 44-750 SEQ ID NO: 50 с N-концевым сигналом (SEQ ID NO: 594), N- концевые авидиновые (SEQ ID NO: 595) и 6-гистидиновые (SEQ ID NO: 596) метки клонировали и экспрессировали, как описано ранее для ВКД PSMA шимпанзе. Биотинилирование белка ВКД PSMA яванского макака выполняли с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструкта экспрессии BirA, и полученный секретированный белок очищали двухэтапной очисткой с использованием колонки IMAC HisTrap HP (GE Healthcare) и колонок MonoAvidin. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин. Этот материал также использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG1.

Второй рекомбинантный белок ВКД PSMA яванского макака (PSMA яванского макака с Fc, SEQ ID NO: 54) с Fc IgG1 (SEQ ID NO: 593) клонировали и экспрессировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Белок PSMA яванского макака с Fc временно экспрессировался в клетках 293HEK-expi. Продукт временной трансфекции PSMG3 в клетках HEK293.Expi собирали через 5 суток после трансфекции, осветляли центрифугированием (30 мин, 6000 об/мин) и фильтровали (0, 2 мкМ мембрана из полиэфирсульфона, Corning). Относительное количество IgG определяли с помощью прибора Octet (ForteBio) с использованием очищенного известного IgG (того же изоформа), добавленного в отработанный среду для построения стандартной кривой.

Осветленный супернатант с PSMA яванского макака с Fc загружали в уравновешенную (dPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure Protein A (GE Healthcare) при относительной концентрации ~30 мг белка на мл смолы. После загрузки колонку промывали в dPBS при pH 7,2, и белок элюировали с использованием 10 объемов колонки 0,1 М натрий ацетата, pH 3,5. Фракции пика объединяли, нейтрализовали 2 М трис, pH 7, и фильтровали (0,2 мкМ). Нейтрализованный образец белка подвергали диализу против 3 замен dPBS, содержащего  $Ca_2^+$ ,  $Mg_2^+$  и 0,5 мМ  $ZnCl_2$ , pH 7,2, в течение ночи при 4°C. На следующий день образец снимали с диализа, фильтровали (0,2 мкМ) и определяли концентрацию белка по оптической плотности при 280 нМ на спектрофотометре BioTek SynergyHTM. Качество очищенных белков оценивали методами ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex). Уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-теста (Pyrotell-T, Associates of Cape Cod). Очищенные белки хранили при 4°C.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен PSMA человека (ВКД) (ВКД PSMA человека, SEQ ID NO: 55), соответствующий аминокислотам 44-750 из SEQ ID NO: 51 с N-концевыми авидиновыми и 6-гистидиновыми метками (SEQ ID NO: 596) клонировали, экспрессировали и очищали так, как описано ранее для белков ВКД PSMA шимпанзе и яванского макака.

### 2.3. Идентификация Fab к PSMA шимпанзе и человека.

Пэннинг срекомбинантным белком.

Пэннинг в растворе полученных de novo библиотек человеческого Fab-pIX [Shi, L. et al., J. Mol. Biol., 2010, 397(2):p. 385-396. WO 2009/085462], состоящую из библиотек тяжелых цепей VH1-69, 3-23 и 5-51, спаренных с четырьмя библиотеками генов VL человеческой зародышевой линии (A27, B3, L6, O12), выполняли с использованием подхода чередующегося пэннинга с одним циклом захвата фага на стрептавидиновых гранулах (Invitrogen, кат. № 112.05D, партия № 62992920), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя, с последующим захватом фага на гранулах ProtG (Invitrogen, кат. № 10003D), покрытых PSMA яванского макака с Fc в соответствии с протоколом производителя с последующим захватом фага на магнитных

нейтравидиновых гранулах Sera-mag Double Speed (Thermo, кат. № 7815-2104-011150), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя. В результате пэннинга получили два отобранных соединения: PSMM18 и PSMM25.

Цельноклеточный пэннинг Fab к PSMA.

Дополнительные эксперименты с пэннингом проводили на целых клетках с использованием выходных данных Раунда № 1 описанных выше экспериментов с пэннингом ВКД шимпанзе или только полученных библиотек фагов de novo в качестве входных данных. Вкратце фаг получали посредством инфекции хелперного фага и концентрировали посредством осаждения с помощью ПЭГ/NaCl в соответствии со стандартными протоколами, известными в данной области техники. Фаговые библиотеки предварительно очищали на нетрансфицированных исходных клетках HEK293F в течение ночи при 4°C с осторожным покачиванием. После осаждения с помощью ПЭГ/NaCl предварительно очищенные библиотеки инкубировали с PSMA-экспрессирующими клетками HEK293 или клетками LNCaP при осторожном покачивании в течение 2 ч при 4°C. Удаление несвязанного фага и выделение связанных с фагом клеток проводили с помощью градиента фикола, и после нескольких стадий промывки клетки, несущие связанный фаг, инкубировали с 1 мл культуры TG-1 E.coli при 37°C в течение 30 мин без встряхивания. Полученную смесь высевали на чашки с лизогенным бульоном с карбенициллином и 1% глюкозой и выращивали в течение ночи при 37°C. Затем процесс повторяли для последующих раундов пэннинга.

Превращение фага Fab-pIX в Fab-His для получения супернатантов E.coli.

Полученные отобранные соединения из фагов Fab-pIX превращали в Fab-His с использованием стандартной процедуры. Плазмидную ДНК выделяли из E.coli, используемой в фаговом пэннинге, (набор Plasmid Plus Maxi Kit, Qiagen, кат. № 12963) и подвергали расщеплению рестриктазами NheI/SpeI. Полученные фрагменты размером 5400 и 100 п.н. разделяли на агарозном геле с концентрацией 0,8% и фрагмент из 5400 п.н. очищали на геле (набор MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, кат. № 28006). Очищенную полосу размером 5400 п.н. подвергали самолигированию с использованием лигазы T4, и полученный продукт (кодирующий гибрид Fab-his) снова трансформировали в штамм E.coli TG-1 и клонировали. Супернатанты Fab-His создавали из клонов путем индукции в течение ночи культур с помощью 1 mM IPTG. После центрифугирования культивируемой в течение ночи культуры осветленные супернатанты были готовы для использования в последующих анализах. Для определения относительных уровней экспрессии различных супернатантов Fab-his проводили ИФА к каппа (Southern Biotech, кат. № 2061-05) на серийно разведенных супернатантах. Все протестированные клоны продемонстрировали сходную экспрессию Fab-his (данные не показаны).

Клеточное связывание гибридов Fab-his из E.coli

Для оценки способности связывания отдельных гибридов Fab-his из супернатантов E.coli с клетками, экспрессирующими PSMA, был разработан клеточный анализ связывания. Отдельные клоны Fab выделяли из раунда 3 всех экспериментов с пэннингом после вырезания рГХ. Клоны Fab тестировали на связывание с клетками HEK, экспрессирующими PSMA шимпанзе и яванского макака, а также с PSMA человека на клетках LNCaP. Вкратце клетки, экспрессирующие PSMA, помещали в аликвоты планшета с V-образным дном (CoStar 3357) при плотности 200000 на лунку и инкубировали с (100 мкл) супернатантами, экспрессирующими Fab-фрагменты, в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и окрашивали конъюгированным с RPE мышинным антителом к человеческой легкой цепи каппа (Life Technologies, кат. № MH10514) в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и ресуспендировали в 100 мкл того же промывочного буфера. Планшеты считывали на проточном цитометре BD FACS. Данные FACS были проанализированы в программном обеспечении FlowJo путем гейтирования нормальной популяции клеток в реальном времени с использованием прямого и бокового рассеяния, а затем анализа клеток внутри этого гейта на окрашивание PE. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) и экспортировали в Microsoft Excel. Клоны Fab, которые проявляли  $\geq 3$ -кратный фон связывания для всех трех видов PSMA (яванского макака, шимпанзе и человека) и не проявляли связывания с линией клеток HEK293, были помечены как "предварительно положительные". Fab секвенировали и переносили для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для повторного скрининга. Истинно положительные результаты были выбраны из связывания супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, с линиями клеток, экспрессирующими PSMA.

Получение Fab млекопитающих.

Для преобразования Fab E.coli в экспрессируемый млекопитающими Fab использовали In-Fusion HD Cloning (ClonTech, кат. № 638918) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце нуклеотидные последовательности клонов, которые прошли первичный скрининг и должны быть переведены в формат Fab млекопитающих, загружаются в программу "InFu Primer Finder v1.2.3" (программное обеспечение, разработанное самостоятельно), которая генерирует перечень изотип-специфических праймеров для ПЦР, используемых для создания ПЦР-фрагментов для клонирования In-Fusion в векторы экспрессии huKappaIgGSP и huG1 Fab. Эти векторы представляют собой векторы собственной разработки с промоторами CMV на основе pcDNA3.1. После процесса In-fusion клоны E.coli

выделяли, последовательность проверяли и трансфицировали в клетки HEK293, используя стандартные протоколы. Fab к PSMA млекопитающих для подтверждения связывания с линиями клеток, экспрессирующими PSMA, получали путем сбора 20 мл супернатантов через 5 суток после трансфекции.

Повторный скрининг отобранных вариантов из цельноклеточного пэннинга в формате супернатантов клеток млекопитающих

Подтверждение наличия супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, выполняли с использованием анализа связывания целых клеток, описанного ранее. Исследовали связывание Fab с клетками PSMA человека (LNCaP), шимпанзе и яванского макака, а также проводили обратный скрининг на отсутствие связывания с исходной клеточной линией HEK. В табл. 14 показан профиль отобранных соединений в отношении связывания супернатанта Fab млекопитающих с PSMA-экспрессирующими клетками. Многие отобранные соединения из супернатантов E.coli не подтверждаются белками, экспрессируемыми млекопитающими. PSMM48 продемонстрировало высокое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA яванского макака, и некоторое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе, но отсутствие связывания с клетками LNCaP, экспрессирующими PSMA человека. PSMM56 продемонстрировал аналогичный профиль, но с некоторым связыванием с клетками LNCaP. PSMM69-80 связывается с клетками LNCaP, но не с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе или яванского макака. Супернатанты Fab млекопитающих PSMM52, M56 и M57 связывались со всеми тремя клеточными линиями. PSMM50, M51 и M54 демонстрируют большее связывание с клетками шимпанзе или яванского макака. M58 демонстрировало незначительное связывание с клетками шимпанзе и яванского макака.

Таблица 14

Профиль отобранных соединений связывания белка Fab млекопитающих с клетками, экспрессирующими PSMA по данным измерения гео-СИФ (средняя флуоресцентная интенсивность)

<b>ID Fab (ID ДНК Fab)</b>	<b>Яванский макак</b>	<b>Шимпанзе</b>	<b>LNCaP</b>	<b>Исходная HEK</b>
PSMB10 (PSMM10)	244	81,6	-	248
PSMB11 (PSMM11)	19	6,6	-	8,14
PSMB12 (PSMM12)	31,6	8,05	-	12,6
PSMB13 (PSMM13)	57,8	18,2	-	50,5
PSMB14 (PSMM14)	32,6	13,1	-	22,2
PSMB15 (PSMM15)	40,4	18,5	-	38
PSMB16 (PSMM16)	175	220	-	6,39
PSMB17 (PSMM17)	34,9	22,4	-	40,1
PSMB18 (PSMM18)	696	439	-	8,71
PSMB19 (PSMM19)	53,7	-	5,15	4,47
PSMB20 (PSMM20)	5,75	-	5,85	41,3
PSMB21 (PSMM21)	94,4	-	20,7	372
PSMB22 (PSMM22)	9,07	-	7,92	54,9
PSMB23 (PSMM23)	16,4	-	6,66	164
PSMB24 (PSMM24)	14,6	9,6	4,09	3,96
PSMB25 (PSMM25)	15,2	11,3	16,9	4,09
PSMB26 (PSMM26)	9,48	-	7,26	114
PSMB27 (PSMM27)	20	-	7,56	136
PSMB28 (PSMM28)	29,7	-	8,88	302
PSMB29 (PSMM29)	6,87	-	5,7	72,8
PSMB30 (PSMM30)	5,16	-	4,58	45
PSMB31 (PSMM31)	5,99	-	-	25,5
PSMB32 (PSMM32)	4,81	-	-	27,1
PSMB33 (PSMM33)	5,14	-	-	40,1
PSMB34 (PSMM34)	17,9	-	-	107
PSMB35 (PSMM35)	58,5	-	-	231
PSMB36 (PSMM36)	5,05	-	-	6,96
PSMB37 (PSMM37)	23,4	-	-	178

## 045935

PSMB38 (PSMM38)	4,05	-	-	7,7
PSMB39 (PSMM39)	10,2	-	-	166
PSMB40 (PSMM40)	66,9	-	-	348
PSMB41 (PSMM41)	5,39	-	-	12
PSMB42 (PSMM42)	7,35	-	-	25,8
PSMB43 (PSMM43)	8,73	-	-	7,18
PSMB44 (PSMM44)	12,6	-	-	48,9
PSMB45 (PSMM45)	22,4	-	-	43,1
PSMB46 (PSMM46)	3,88	-	-	5,29
PSMB47 (PSMM48)	101	25,5	3,46	2,85
PSMB48 (PSMM49)	2,72	3,18	2,68	2,72
PSMB49 (PSMM50)	51,6	22	3,22	3,48
PSMB51 (PSMM52)	285	231	41,5	2,68
PSMB52 (PSMM53)	39,2	6,89	2,67	2,56
PSMB53 (PSMM54)	27,6	17,8	4	2,6
PSMB54 (PSMM55)	2,7	2,75	2,65	2,79
PSMB55 (PSMM56)	226	180	17,2	2,58
PSMB56 (PSMM57)	95,6	34,7	24,5	2,52
PSMB57 (PSMM58)	19,8	11	3,26	2,68
PSMB58 (PSMM59)	121	192	25,3	2,67
PSMB59 (PSMM60)	4,96	9,69	6,04	3
PSMB60 (PSMM61)	2,28	3,07	87,3	4,64
PSMB61 (PSMM62)	2,1	3,16	135	2,98
PSMB62 (PSMM63)	7,17	4,43	54,9	9,09
PSMB63 (PSMM64)	2,07	2,95	27	2,82
PSMB64 (PSMM65)	2,39	3,26	70,5	3,05
PSMB65 (PSMM66)	2,3	3,13	32,4	4,25
PSMB66 (PSMM67)	2,14	3	24,6	2,83
PSMB67 (PSMM68)	2,23	2,95	21	2,95
PSMB68 (PSMM69)	5,44	-	134	35,3
PSMB69 (PSMM70)	2,29	3,38	25,5	3,35
PSMB70 (PSMM71)	2,22	3,49	15,5	3,26
PSMB71 (PSMM72)	2,54	4,4	18,5	3,07
PSMB72 (PSMM73)	2,13	3,53	227	3,02
PSMB73 (PSMM74)	2,97	4,13	125	11,1
PSMB74 (PSMM75)	120	-	178	132
PSMB75 (PSMM76)	2,99	3,04	173	7,89
PSMB76 (PSMM77)	3,75	3,99	138	3,95
PSMB77 (PSMM78)	4,68	3,96	144	4,71
PSMB78 (PSMM79)	25,2	-	378	24,4
PSMB79 (PSMM80)	38,4	-	512	157
PSMB80 (PSMM81)	19,6	18,6	20,9	6,61
PSMB81 (PSMM82)	2,63	2,06	4,07	2,69
PSMB82 (PSMM83)	2,79	2,23	4,11	2,76
PSMB83 (PSMM84)	2,59	2,28	4,09	2,74

## 045935

PSMB84 (PSMM85)	750	729	192	3,15
PSMB85 (PSMM86)	2,84	2,59	2,33	3,24
PSMB86 (PSMM87)	224	176	31,7	2,82
PSMB87 (PSMM88)	2,63	2,27	4,23	2,91
PSMB88 (PSMM89)	37,7	29,7	30,3	7,6
PSMB89 (PSMM90)	27,1	27,3	53,2	39,5
PSMB90 (PSMM91)	26,7	24,7	47,1	36,4
PSMB91 (PSMM92)	8,97	6,16	13	6,63
PSMB92 (PSMM93)	20	16,5	57,1	50
PSMB93 (PSMM94)	5,13	9,62	2,5	3,66
PSMB94 (PSMM95)	5,12	2,67	2,22	3,57
PSMB95 (PSMM96)	8,9	8,82	13,4	11,4
PSMB96 (PSMM97)	2,4	3,25	2,53	4,03
PSMB97 (PSMM98)	2,57	4,73	2,52	3,7
PSMB99 (PSMM100)	9,95	2,4	2,39	4,03
PSMB100 (PSMM101)	4,03	2,52	2,33	3,37
PSMB100 (PSMM101)	3,5	2,86	2,48	4,57
PSMB101 (PSMM102)	5,49	3,18	2,23	3,33
PSMB102 (PSMM103)	2,4	2,42	2,16	3,2
PSMB103 (PSMM104)	3,52	3,26	2,58	4,44
PSMB104 (PSMM105)	2,15	2,5	2,34	3,95
PSMB105 (PSMM106)	2,03	2,39	2,18	3,39
PSMB106 (PSMM107)	2	2,4	2,27	3,59
PSMB107 (PSMM108)	2	2,47	2,33	3,49
PSMB108 (PSMM109)	2	2,58	2,28	3,46
PSMB109 (PSMM110)	321	326	34,9	6,11
PSMB110 (PSMM111)	2,3	2,31	2,31	3,4
PSMB111 (PSMM112)	2,32	2,31	-	3,21
PSMB112 (PSMM113)	6,28	5,7	2,71	3,28
PSMB113 (PSMM114)	2,82	2,95	2,32	3,29
PSMB114 (PSMM115)	2,78	2,47	4,3	3,14
PSMB115 (PSMM116)	2,66	2,59	2,2	3,14
PSMB46 (PSMM117)	4,54	3,18	2,21	4,79
PSMB67 (PSMM118)	3,95	4,3	3	6,13
PSMB74 (PSMM119)	7,94	13	3,16	12,5

PSMB78 (PSMM120)	5,08	4,79	22,3	6,82
PSMB81 (PSMM121)	3,66	3,83	3,05	5,11
PSMB82 (PSMM122)	15,1	28,4	10,8	24,3
PSMB83 (PSMM123)	37,5	42,1	3,04	4,88
PSMB85 (PSMM124)	34,6	52,9	20,7	46,8
PSMB87 (PSMM125)	4,23	3,74	2,26	4,73
PSMB89 (PSMM126)	51,8	53,1	11,7	6,27
PSMB90 (PSMM127)	42,8	30,2	7,74	5,99
PSMB91 (PSMM128)	3,9	27,6	2,37	4,32
PSMB92 (PSMM129)	45,7	37,3	12,1	7,4
PSMB93 (PSMM130)	5,13	7,85	4,11	7,82
PSMB94 (PSMM131)	3,67	3,23	2,32	4,72
PSMB95 (PSMM132)	4,05	3,64	2,56	5,57
PSMB96 (PSMM133)	3,91	4,54	2,37	4,65
PSMB97 (PSMM134)	3,22	3,16	4,08	4,22
PSMB98 (PSMM135)	15,6	12,7	2,22	4,21
PSMB99 (PSMM136)	4,08	3,26	2,22	5,04
PSMB100 (PSMM137)	5,24	3,82	2,16	4,83
PSMB101 (PSMM138)	3,84	3,14	2,23	4,52
PSMB102 (PSMM139)	4,51	3,82	2,23	4,59
PSMB103 (PSMM140)	6,81	4,27	2,21	5,41
PSMB104 (PSMM141)	7,52	4,35	2,26	4,39
PSMB105 (PSMM142)	5,03	11,2	4,87	7,28
PSMB106 (PSMM143)	3,87	3,8	2,73	4,9
PSMB107 (PSMM144)	3,3	3,35	2,3	4,64
PSMB108 (PSMM145)	6,78	3,83	2,33	4,98
PSMB110 (PSMM146)	4,03	3,23	2,28	5,3
PSMB111 (PSMM147)	3,71	3,26	2,36	5,11
PSMB112 (PSMM148)	4,54	3,26	2,26	4,86
PSMB113 (PSMM149)	84,3	104	51,7	94,2
PSMB114 (PSMM150)	3,31	3,26	2,21	5,14
PSMB115 (PSMM151)	3,55	3,43	2,3	4,21

Кривые доза-ответ для Fab, экспрессируемых млекопитающими После подтверждения положительного связывания клонов Fab, экспрессируемых млекопитающими, в виде чистых супернатантов Fab с линиями клеток, экспрессирующих PSMA, супернатанты нормализовали по концентрации белка с помощью Octet или белкового геля, и строили кривые доза-ответ для подтверждения связывания PSMA с использованием протокола, описанного ранее. На фиг. 22-24 показаны кривые титрования для отобранных соединений, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя PSMA-экспрессирующими клетками. На фиг. 22А, 22В, 22С и 22D показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток LNCaP. На фиг. 23А, 23В, 23С и 23D показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA шимпанзе. На фиг. 24А, 24В, 24С и 24D показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA яванского макака. Профили связывания среди отобранных соединений сравнивали между линиями клеток, экспрессирующими различные виды PSMA. В экспериментах в качестве положительного контроля использовали супернатант PSMM52. Некоторые отобранные соединения были лишены приоритета из-за N-связанных сайтов гликозилирования в CDR, связывания с PSMA-отрицательной исходной клеточной линией HEK или отсутствия связывания с PSMA-положительными клеточными линиями. Оставалось одиннадцать отобранных Fab, а 10 последовательностей отобранных соединений клонировали в конструкции тяжелой цепи человеческого IgG4 PAA и использовали для создания биспецифических антител к PSMA×CD3. Эти отобранные соединения продемонстрировали межвидовое связывание в пределах 3 раз относительно друг от друга и



были перенесены в формат биспецифических антител для тестирования на предмет перенаправления Т-клеток, уничтожающих PSMA-положительные мишени. Антигены для пэннинга для каждого отобранного соединения показаны в табл. 15.

Таблица 15

Антиген для каждого из отобранных при помощи фагового пэннинга соединений

Антиген раунда 1	Антиген раунда 2-3	Отобранные соединения	Идентификация отобранных соединений
ВКД PSMA шимпанзе	ВКД PSMA яванского макака	2	PSMM18, PSMM25
ВКД PSMA шимпанзе	НЕК, экспрессирующие PSMA шимпанзе	9	PSMM50, PSMM52, PSMM57, PSMM59, PSMM110, PSMM56, PSMM85, PSMM84
LNCaP	НЕК, экспрессирующие PSMA шимпанзе	2	PSMM87, PSMM81

Получение мкАт к PSMA.

Всего 12 клонов, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя клетками, экспрессирующими PSMA, в конечном итоге были преобразованы в мкАт IgG4, имеющее замены в Fc изотипа S228P, F234A и L235A (PAA), посредством рестрикционного клонирования. Вкратце конструкторы, соответствующие клонам Fab, прошедшим первоначальный скрининг, расщепляли HindIII и ApaI. Очищенные в геле фрагменты лигировали в вектор экспрессии с промотором CMV vDR000215, вектором экспрессии, управляемым CMV, содержащим человеческий Fc IgG4-PAA, для экспрессии полноразмерного мкАт. Это позволило быстро получить биспецифические антитела. Ранее описанный вектор экспрессии использовали для экспрессии тяжелой и легкой цепей для каждого мкАт к PSMA, при этом оба вектора временно котрансфицировали в линии клеток 293Expi или CHO для экспрессии мкАт. Последовательности CDR межвидовых положительных Fab к PSMA, полученных в результате фагового пэннинга, показаны ниже в табл. 16. Последовательности VH и VL выбранных Fab приведены ниже в табл. 17. Последовательности тяжелой и легкой цепей мкАт, полученных из Fab, показаны в табл. 18.

Таблица 16

Последовательности CDR (определенные по Kabat) антител после фагового пэннинга (соответствующие SEQ ID NO перечислены в скобках)

ID FAB		CDR (SEQ ID NO: )		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB109	HC	NAWIS (62)	WINPESGRANYAQKF QG (63)	ELYLVYSTYYYAFDY (64)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB86	HC	SYDIS (67)	GIIPIEGTANYAQKFQ G (68)	DYPAGYGFYD (69)
	LC	RASQSVSSSYLA (70)	GASSRAT (71)	QQYGSSPLT (72)
PSMB84	HC	SDWMS (73)	AISGNGGSTYADSV KG (74)	DPYYYYDGDSYYGMD V (75)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)
PSMB83	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSV KG (79)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)

PSMB56	HC	SYAIS (84)	WISPYNGNANYAQKF QG (85)	DSDRSYNLDY (86)
	LC	RASQSIGWLN (87)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)
PSMB55	HC	SYWIG (89)	IYPGSDTRYSPSFQG (90)	GLPIWYLDY (91)
	LC	RASQSVASDLA (92)	FASNRAT (93)	QQSITWPFT (94)
PSMB51	HC	SYAIS (95)	WIIPYNGNANYAQKF QG (96)	VNSAALVWERLDY (97)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB49	HC	SYAIS (84)	GIPIFGTANYAQKFQ G (98)	ASRVWHASYGYLDY (99)
	LC	RASQSVSKWLA (100)	DASNRAT (82)	QQRFTAPWT (101)
PSMB25	HC	SYWIG (89)	IYPGSDTRYSPSFQG (90)	GWAYDRGLDY (102)
	LC	KSSQSVLYSSNN KNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB18	HC	SYWIG (89)	IYPGSDTRYSPSFQG (90)	AYHYSKGLDY (106)
	LC	KSSQSVLYSSNN KNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB80	HC	DY AIS (107)	RIDPIEGTANYAQKFQ G (108)	DRYYDGVYWYSDYF DY (109)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)
PSMB58	HC	SYWIS (56)	IYPGDSYTRYSPSFQG (57)	DYEWELFDSRLDY (58)
	LC	RASQSISSYLN (59)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)

Таблица 17

## Последовательности VH и VL Fab к PSMA

ID FAB	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB10 <sup>9</sup>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNSAALVWERL	110	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL	111

	DYWGQGLTVTVSS		TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	
PSMB86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSYDISWVRQAPGQG LEWMGGIPIEGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDYPAGYGFYWGQG TLVTVSS	112	EIVLTQSPGTLISLSPG ERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQ QYSSPLTFGQGTK VEIK	113
PSMB84	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFDSWMSWVRQAPGKG LEWVSAISGNGGSTTEYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDPYYYDGDSSYY GMDVWGQGLTVTVSS	114	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	115
PSMB83	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGLTVTVSS	116	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	117
PSMB80	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFDDYAIWVRQAPGQG LEWMGRIDPIEGTANYAQKFQ RVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDRYYYDGVYWYS DYFDYWGQGLTVTVS	118	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	119
PSMB58	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWISWVRQMPGKGL EWMGIIPGDSYTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCARDYEWELFDSRLDYW GQGLTVTVSS	120	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGTKVE IK	115
PSMB56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAIWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSDRSYNDYW GQGLTVTVSS	121	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRASQSISS GWLWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGQGTK VEIK	122
PSMB55	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK	123	EIVLTQSPATLSLSPG	124

	GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARGLPIWYLDYWGQGT LVTVSSA		ERATLSCRASQSVAS DLAWYQQKPGQAP RLLIYFASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QSITWPFTFGQGTKV EIK	
PSMB51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG LEWMGWIIYPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNSAALVWERL DYWGQGT LVTVSS	125	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	111
PSMB49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARASRVWHASYGYLDY WGQGT LVTVSS	126	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSK WLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRFTAPWTFGQGTK VEIK	127
PSMB25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARGWAYDRGLDYWGQ GTLTVSS	128	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAE DVAVYYCQYYSTPL TFGQGTKVEIK	129
PSMB18	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARAYHYSKGLDYWGQ GTLTVSS	130	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAE DVAVYYCQYYSTPL TFGQGTKVEIK	131

Таблица 18

Последовательности тяжелой и легкой цепей  
моноклональных антител к PSMA с соответствующими SEQ ID NO

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB129 (FAB PSMB109)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSKKASGGTFSSY AISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC	132	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDRWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSP RYPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT	133

	SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGK		ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
PSMB130 (FAB PSMB86)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFKSYDISWVRQ APGQGLEWMGGIPIEGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDTAVYYCAR DYPAGYGFYWGQGTLLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTY SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRV SKYGPPCPPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLGK	134	EIVLTQSPGTLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	135
PSMB128 (FAB PSMB84)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFDSDWMSWVRQ APGKGLEWVSAISNGGSTE YADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DPYDYDGDSDYGMVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPAP	136	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSISSYLWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	137

	EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK			
PSMB127 (FAB PSMB83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	138	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	139
PSMB126 (FAB PSMB80)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFDDYAIWVR QAPGQGLEWMGRIDPIEGTA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDVAVYYCA RDRYYYYDGVYWYSDYFDY WGQGTTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGL	140	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTI ISSLPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	137

	LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG K			
PSMB124 (FAB PSMB56)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGNA NYAQKFQGRVTTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCA RSDRSYNLDYWGGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK	141	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSIGWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFGSGSGTDFTL TISSLPEDFATYYCQSY STPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	142
PSMB123 (FAB PSMB55)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDSDR YSPSFQGVVVISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYVCARG LPIWYLDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEG	143	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVASDLAWYQ QKPGQAPRLLIYFASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQSIT WPFTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	144

	NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK			
PSMB122 (FAB PSMB51)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWIIPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	145	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSIDRWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSP RYPLTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	133
PSMB121 (FAB PSMB49)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTAN YAKKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDTAVYYCAR ASRVWHASYGYLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	146	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSKWLAWY QQKPGQAPRLIYDASNR ATGIPARFSGSGSDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQR TAPWTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	147
PSMB120 (FAB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDSDR	148	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPKLLI	149



PSMB25)	YSPSFQGGVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYVCARG WAYDRGLDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK		YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
PSMB119 (FAB PSMB18)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIYPGSDTR YSPSFQGGVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYVCARA YHYSKGLDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK	150	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE C	149
PSMB87 (FAB PSMB58)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMGIYPGDSYTR YSPSFQGGVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYVCARD YEWELFDSRLDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPV	151	DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSISSYLWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ	137
	TVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK		WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTSLK ADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	

Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB119, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 130 и VL с SEQ ID NO: 131 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB120, содержащее области VH и

VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 128 и VL с SEQ ID NO: 129 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB121, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 126 и VL с SEQ ID NO: 127 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB122, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 125 и VL с SEQ ID NO: 111 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB123, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 123 и VL с SEQ ID NO: 124 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB124, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 121 и VL с SEQ ID NO: 122 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB126, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 118 и VL с SEQ ID NO: 119 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB127, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 116 и VL с SEQ ID NO: 117 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB128 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 114 и VL с SEQ ID NO: 115 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB129 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 110 и VL с SEQ ID NO: 111 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB130 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 112 и VL с SEQ ID NO: 113 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A.

#### 2.5. Кристаллическая структура ВКД PSMA человека, связанного с Fab к PSMA.

PSMB83 (также известный как PSMM84).

PSMA представляет собой гомодимерный белок, экспрессируемый на клеточной поверхности. PSMA представляет собой интегральный гликопротеин типа II из 750 остатков на мономер, состоящий из большого домена ВКД (705 остатков) с пептидазной активностью, однопроходного ТМ домена и короткого внутриклеточного домена из 19 остатков. Кристаллическая структура внеклеточной области (ВКД) человеческого PSMA, связанного с Fab-плечом к PSMA из биспецифического антитела PS3B27, была определена с разрешением 3,15 Å, чтобы лучше охарактеризовать сайт объединения между PSMA и антителом.

Внеклеточную область человеческого PSMA (остатки 44-750) экспрессировали в клетках насекомых High Five™ с N-концевым сигнальным пептидом gp67 с последующей расщепляемой гексагистиридиновой меткой (SEQ ID NO: 596). Секретируемый белок очищали из супернатанта с помощью трехэтапной процедуры, включающей начальный Ni<sup>2+</sup>-NTA аффинный захват, TEV-опосредованное расщепление гистиридиновой метки с последующей стадией обратной аффинной хроматографии и заключительной стадией эксклюзионной хроматографии. Очищенный PSMA-ВКД замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C в 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> Fab PSMB83 (также известного как PSMM84), который является исходным Fab-плечом против PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, экспрессировался в клетках HEK293 Expi с гексагистиридиновой меткой (SEQ ID NO: 596) и очищали с помощью аффинной (HisTrap, GE Healthcare) и гель-фильтрационной хроматографии (SEC-300, Phenomenex Yarra). Fab хранили при 4°C в 50 mM NaCl, 20 mM Трис, pH 7,4.

Комплекс ВКД PSMA человека/Fab PSMB83 получали с помощью трехстадийной процедуры. Сначала Fab заменяли на 20 mM MES, pH 6,0, 150 mM NaCl. Затем Fab и PSMA смешивали (1,5 молярный избыток Fab по отношению к мономеру PSMA) и инкубировали в течение ночи при 4°C при диализе в 20 mM MES, pH 6,0. Наконец, комплекс связывали с колонкой monoS 5/50 в 20 mM MES, pH 6,0, и элюировали градиентом NaCl.

Кристаллы, подходящие для рентгеноструктурного анализа, были получены с использованием метода диффузии паров в сидячей капле при 20°C и робота Mosquito LCP (TTP Labtech). Кристаллы Fab PSMB83, связанного с ВКД PSMA человека, выращивали из 18% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M Трис, pH 8,5 с микрозатравками и комплексом PSMA/Fab первоначально в концентрации 7,3 мг/мл. Кристаллы несвязанного PSMB83 Fab получали из 25% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M LiCl, 0,1 M ацетата pH 4,5, при этом Fab первоначально содержалось в концентрации 8,8 мг/мл.

Структуры были расшифрованы путем молекулярного замещения (MR) с помощью Phaser (программное обеспечение Phaser Crystallographic Software, Кембриджский университет). Поисковой моделью MR для структуры Fab PSMB83 (также называемой PSMM84) был код PDB 4M6O. Структуру комплекса PSMA/Fab определяли с использованием кристаллических структур PSMA (код PDB: 2C6G) и PSMB83 Fab (структура с разрешением 1,93 Å; данные не показаны) в качестве поисковых моделей MR. Структуры были уточнены с помощью PHENIX (Adams et al., 2004), а корректировки модели были выполнены с помощью COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Все остальные кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета программ CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Все молекулярные графики были созданы с помощью PyMol (система молекулярной графики

PyMOL, версия 1.4.1, Schrodinger, LLC), а определяющие комплементарность области (CDR) были определены с использованием определения по Kabat.

Структура PSMA/Fab включает остатки 1-211 легкой цепи Fab, остатки 1-224 тяжелой цепи Fab (за исключением остатков 138-146, которые неупорядочены) и остатки 56-750 PSMA, что соответствует протеазе (остатки 56-116 и 352-590), апикальный (остатки 117-351) и спиральный (остатки 591-750) домены и семь из десяти возможных N-связанных гликанов (в Asp-76, -121, -140, -195, -459, -476 и -638) на субъединицу димера PSMA. Активный участок PSMA яванского макака размещен на поверхности раздела между тремя доменами, и он содержит два атома цинка, скоординированных гистидином (H377 и H553) и остатками глутамата/аспартата (D387, каталитический E424, E425 и D453), и молекулу воды. Кристаллическое асимметричное звено содержит один димер PSMA, причем каждая субъединица связана аналогично Fab PSMB83. Сайт связывания Fab/PSMA хорошо определяется картой электронной плотности, что позволяет надежно позиционировать связывающие остатки. Молекулы Fab и PSMA последовательно пронумерованы на фиг. 25-30.

Эпитоп, паратоп и взаимодействия PSMB83. PSMB83, который является исходным Fab-плечом к PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, распознает конформационный и прерывистый эпитоп в апикальном домене PSMA (фиг. 25). Площадь поверхности PSMA, погруженная Fab, составляет около 700 Å<sup>2</sup>. В частности, остатки эпитопа PSMB83 представляют собой 1138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326. Спираль α7 (остатки Y299-E307) является преобладающей областью эпитопа и связывается через CDR тяжелой и легкой цепей Fab. На одном конце спирали Y299 и Y300 образуют ароматический кластер с остатками Fab Y57<sup>H</sup>, W94<sup>L</sup> и остатками PSMA F235 и P237, тогда как E307 на другом конце спирали образует соляной мостик с R91<sup>L</sup> и водородными связями Y32<sup>L</sup>. На фиг. 26 и 27 показаны основные взаимодействия PSMA с легкой и тяжелой цепями PSMB83. Остатки эпитопа PSMB83 являются консервативными для человека и яванского макака (фиг. 28), и было продемонстрировано, что биспецифическое антитело PS3B27 связывается со сходной аффинностью с PSMA человека и яванского макака. Напротив, ожидается, что мутации эпитопа G238A и особенно Y300D от человека к мыши будут снижать аффинность связывания PSMB83 с мышинным PSMA по сравнению с человеческим. Мутация Y300D нарушает контакт водородной связи с N59<sup>H</sup> и взаимодействие π-стэкинга с W94<sup>L</sup>.

Паратоп PSMB83 состоит из остатков всех CDR, кроме CDR-L2 и CDR-H1 (фиг. 29). В частности, остатки паратопа представляют собой S30<sup>L</sup>, Y32<sup>L</sup>, R91<sup>L</sup>, S92<sup>L</sup>, W94<sup>L</sup> легкой цепи и G56<sup>H</sup>-N59<sup>H</sup>, K65<sup>H</sup>, G66<sup>H</sup>, Y101<sup>H</sup>, V107<sup>H</sup> и D109<sup>H</sup> тяжелой цепи. На фиг. 30 показаны контакты взаимодействия между PSMA и PSMB83. Удаленное расположение эпитопа способствует связыванию Fab-плеча к PSMB83 в биспецифическом антителе к PS3B27 с мембраносвязанным PSMA, а другое Fab-плечо по-прежнему связано с CD3 в Т-клеточной мембране. Предполагается, что PSMB83 не будет ингибировать ферментативную активность PSMA, поскольку антитело связывается с активным центром и не вызывает каких-либо значительных структурных изменений в PSMA, которые могут повлиять на ферментативную функцию, например, движения петли, которые закрывают активный центр, или смещение каталитических остатков (RMSD 0,3 Å для суперпозиции Ca молекул PSMA в связанных и несвязанных Fab (Barinka et al, 2007) структурах).

#### 2.6. Созревание аффинности антитела к PSMA.

Созревание аффинности проводили на фаговых клонах Fab к PSMA из двух библиотек созревания аффинности PSMA для идентификации антитела с повышенной аффинностью связывания по сравнению с исходным PSMB127 (ID fab=PSMB83, также известное как PSMM84). Были созданы две библиотеки для созревания аффинности PSMB127). В первой библиотеке CDR1 и CDR2 тяжелой цепи рандомизировали в соответствии с дизайном, приведенным в табл. 19 (PH9H9L1). Фрагмент H-CDR3 амплифицировали с помощью ГЦП из pDR000024032 и расщепляли SacII+XhoI. Этот фрагмент клонировали в библиотеку PH9H9L1/PH9L3. Им трансформировали клетки E.coli MC1061F', и получали фаг, отображающий эту библиотеку Fab. Во второй библиотеке CDR легкой цепи были рандомизированы в соответствии с дизайном в табл. 20 (PH9L3L3). Тяжелую цепь из PSMB83 (PSMH360) амплифицировали с помощью ПЦП и расщепляли NcoI+XhoI. Этот фрагмент был клонирован в ДНК библиотеки PH9L3L3 (ELN: фаговая библиотека De Novo 2010 SRI-021). Его трансформировали в клетки E.coli MC1061F' и получили фаг, отображающий эту библиотеку Fab.

Таблица 19

## Дизайн библиотеки PH9H9L1

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Д	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	A	A, E, L, N, R, T, W, Y
52	S	A, D, L, N, R, S
54	S	A, E, N, S, Y
57	S	D, N, R, S, T, Y
59	Д	E, G, N, Q, R, Y

Таблица 20

## Дизайн библиотеки PH9L3L3

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Д	D, N, R, S, Y
49	Д	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	S	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

Пэннинг в растворе для Fab-pIX-библиотек созревания аффинности к PSMA выполняли по отношению к биотинилированному ВКД PSMA человека в течение трех раундов. Связанный с фагом антиген захватывали нейтравидиновыми гранулами (GE Health Care Life Science, кат. № 78152104011150) в соответствии с протоколом производителя с последующими интенсивными промывками 1× PBST (0,05% Твин-20) и длительной инкубацией с немеченым ВКД PSMA в 500-кратном молярном избытке биотинилированного антигена. В результате пэннинга получили клоны, PSMXP46R3\_59H09, PSMXP46R3\_59H06, PSMXP46R3\_59E03, PSMXP46R3\_59C09, PSMXP46R3\_59H01, PSMXP46R3\_59F11, и PSMXP46R3\_59F07.

Для определения уровня экспрессии клонов fab к PSMA 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали в течение ночи при 4°C антителом к Fd IgG человека, промывали и блокировали 3% молоком-PBS-0,05% Твин в течение 1 ч. Образцы супернатанта фага были серийно разбавляли в 2 раза для 11 разведений в блокирующем буфере с последней лункой для контроля. 100 мкл этих растворов захватывали на покрытых планшетах в течение 1 ч. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab')<sub>2</sub> в течение 1 ч. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (фиг. 31).

Для определения связывания клонов Fab к PSMA с рекомбинантным белком человека и яванского макака 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали 100 мкл 5 мкг/мл нейтравидина в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали и блокировали 3% водным раствором PBS-0,05% Твина в течение 1 ч. Рекомбинантные биотинилированные белки PSMA человека и яванского макака захватывали в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и 100 мкл 2-кратно серийно разведенного супернатанта Fab собирали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, а затем инкубировали в течение 2,5 ч с 200 мкл 0,3% молока в PBST, чтобы смыть некоторые из Fab со слабой аффинностью. Затем проводили еще 30 мин инкубации со свежеприготовленными 200 мкл 0,3% молока в PBST для удаления Fab с более слабой аффинностью. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab')<sub>2</sub> в течение 1 ч. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (фиг. 32 и 33).

На фиг. 31 показано, что белковая экспрессия исходного Fab и Fab с созревшей аффинностью была

сходной. Значения оси Y представляют люминесценцию реагента обнаружения, которая соответствует содержанию белка fab на кривой разведения; чем выше показатель люминесценции, тем больше белка в лунке, которое уменьшается при последовательных двукратных разведениях. В лунках с fab со зрелой аффинностью было больше белка, но увеличение по сравнению с исходным было не более чем в пять раз больше, что демонстрируется значениями EC50 (которые представляют собой концентрацию белка, которая дает половину максимального ответа). Эти данные демонстрируют, что различие в профилях связывания с PSMA на фиг. 32 и 33 не связано с различием в концентрации Fab.

На фиг. 32 показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с человеческим рекомбинантным антигеном по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA человека. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинностью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было равно нулю, невозможно было получить EC50.

На фиг. 33 показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с рекомбинантным антигеном яванского макака по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA яванского макака. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинностью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было нулевым, для прямого сравнения нельзя было получить EC50.

В целом профили связывания Fab фагов демонстрируют улучшенное связывание с рекомбинантным антигеном человека и яванского макака по сравнению с исходным мкАт к PSMA (PSMB127). Это улучшение не является результатом различий в профилях экспрессии Fab, как показано на фиг. 33 и 34, демонстрирующих связывание Fab с созревшей аффинностью, нормализованное к уровням экспрессии Fab. Пять лучших Fab-кандидатов, идентифицированных с помощью скрининга на основе ИФА, были получены в формате моноклональных антител IgG4 PAA. В табл. 21 перечислены последующие идентификаторы мкАт, а в табл. 22 и 23 показаны последовательности для их варибельных областей и последовательности для тяжелой и легкой цепей соответственно.

Таблица 21

Пять основных антител со зрелой аффинностью, идентифицированных с помощью ИФА

ID ячейки	HC	LC	ID белка мкАт
	SEQ ID	SEQ ID	
PSMXP46R3_59C09	PSMH859	PSML160	PSMB346
PSMXP46R3_59E03	PSMH859	PSML159	PSMB345
PSMXP46R3_59F07	PSMH862	PSML158	PSMB349
PSMXP46R3_59H01	PSMH860	PH9L3	PSMB347
PSMXP46R3_59H06	PSMH859	PH9L3	PSMB344

Последовательности VH и VL для пяти лучших Fab-кандидатов к PSMA

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
<b>PSMB3 44</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDYSSLYVG DYFDYWGQGLVTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLPEPEFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEI K	117
<b>PSMB3 45</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDYSSLYVG DYFDYWGQGLVTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNYLAWY QQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLPEPEFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEI K	9
<b>PSMB3 46</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDYSSLYVG DYFDYWGQGLVTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLPEPEFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEI K	682
<b>PSMB3 47</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK SRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDYSSLYVG DYFDYWGQGLVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLPEPEFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEI K	117
<b>PSMB3 49</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSLK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDYSSLYVG DYFDYWGQGLVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISLPEPEFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTKVEI K	10

Последовательности тяжелой и легкой цепей пяти лучших кандидатов к PSMA в формате моноклонального антитела IgG4 PAA

<b>ID мкАт</b>	<b>Аминокислотная последовательность тяжелой цепи</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Аминокислотная последовательность легкой цепи</b>	<b>SEQ ID NO</b>
<b>PSMB344</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVEISKYGPCCPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHREAL HNHYTQKSLSLGLGK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	139
<b>PSMB345</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIHDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFAVYYCQQRN PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD	14

	AVLQSSGLYLSVVVTPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK		SKDSTYLSSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
<b>PSMB346</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYLSVVVTPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASYRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRN PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	680
<b>PSMB347</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKSRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYLSVVVTPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE	12	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	139



	QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLK			
<b>PSMB349</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSLKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSS LGTKYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLK	13	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFAVYYCQQRGNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	15

3 Различных HC и 4 различных LC были объединены в матричный формат для увеличения разнообразия отобранных вариантов (табл. 24). Учитывая, что метионин в CDR2 PSMH860 имеет риск посттрансляционной модификации, была создана новая последовательность с M64L и обозначена как PSMH865. PSMH865 соединяли с PSML160 для создания мкАт PSMB365.

Таблица 24

Матричный формат комбинированных 3 тяжелых цепей и 4 легких цепей			
	PSMH859	PSMH860	PSMH862
PH9L3	PSMB344	PSMB347	PSMB358
PSML158	--	PSMB361	PSMB349
PSML159	PSMB345	PSMB362	PSMB359
PSML160	PSMB346	PSMB363	PSMB360

В табл. 25 и 26 представлены последовательности переменных областей из рекомбинированной матрицы и последовательности тяжелой и легкой цепей соответственно.

Последовательности VH и VL отобранных соединений к PSMA из рекомбинированной матрицы

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB3 58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	117
PSMB3 59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	9
PSMB3 60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	682
PSMB3 61	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIK	10
PSMB3 62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	9
PSMB3 63	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGT LVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ	682
			QRRNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB3 65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSDYSSLYVGDYFD YWGQGT LVTVSS	681	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	682

Последовательности тяжелой и легкой цепей  
отобранных соединений к PSMA из рекомбинированной матрицы

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
<b>PSMB3 58</b>	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	139
<b>PSMB3 59</b>	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLA WYQQKPGQAPRLLIHDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRN WPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV	14

	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK		TKSFNRGEC	
<b>PSMB3 60</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	13	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	680
<b>PSMB3 61</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLVVDYF DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	15
<b>PSMB3 62</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN	14

	LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCAPEAAGGPPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGL GK		YLAWYQQKPGQAP RLLIHDAASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
<b>PSMB3 63</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYSSLYVGDYF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCAPEAAGGPPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGL GK	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	680
<b>PSMB3 65</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSDYSSLYVGDYFD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTK YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCAPEAAGGPPSVFLFPPK	679	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES	631
	PKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK		VTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	

В табл. 27 показаны последовательности CDR для всех отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью.

Таблица 27

Последовательности CDR отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью

ID мкАт		CDR (SEQ ID NO: )		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB344	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB345	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (82)	QQRNRWPLT (686)
PSMB346	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNRWPLT (686)
PSMB347	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB349	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB358	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB359	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA	DASNRAT	QQRNRWPLT
		(4)	(82)	(686)
PSMB360	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNRWPLT (686)
PSMB361	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (632)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB362	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (685)	QQRNRWPLT (686)
PSMB363	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (630)	DASYRAT (684)	QQRNRWPLT (686)
PSMB365	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKS (683)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNRWPLT (686)

## 3. Получение и функциональная оценка биспецифических антител к PSMA×CD3.

## 3.1. Создание биспецифических антител к PSMA×CD3.

Были получены два типа биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью: одно, специфическое для нацеливающего плеча (например, антитело к PSMA с созревшей

аффинностью), рекомбинированного с плечом к CD3 высокоаффинного CD3B376 (VH SEQ ID NO: 652, VL SEQ ID NO: 661; HC SEQ ID NO: 640, LC SEQ ID NO: 676) или плечом к CD3 высокоаффинного CD3B450 (VH SEQ ID NO: 657, VL SEQ ID NO: 678, HC SEQ ID NO: 675, LC SEQ ID NO: 677).

Эти исходные мкАт находятся в формате GenMab (Labriijn et al, 2013), в котором нацеливающее исходное мкАт (PSMA) содержит мутацию 409R GenMab (нативную аминокислоту для IgG4), а уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L GenMab и мутацию R409K. Одно из моноспецифических антител к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в Fc-областях. Нацеливающее исходное мкАт (PSMA) находится в формате человеческого IgG4 с заменами в Fc S228P, F234A, L235A. Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях НЕК под контролем промоторов CMV.

Исходные антитела к PSMA и CD3 очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером, содержащим 100 мМ NaAc, pH 3,5, и нейтрализующим буфером 2,5 М Tris, pH 7,2. Нейтрализованные исходные мкАт использовали для получения биспецифических антител к PSMA×CD3. часть исходных мкАт дополнительно заменяли буфером D-PBS, буфером с pH 7,2 для аналитических измерений и анализов.

После очистки выполняли контролируемый обмен Fab-плечами для получения биспецифических антител. Исходные антитела к PSMA смешивали с желаемым исходным антителом к CD3 в восстанавливающих условиях в 75 мМ -2-МЕА (2-меркаптоэтиламина) и инкубировали при 31°C в течение 4 ч или при комнатной температуре в течение ночи. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, в которых для сведения к минимуму количества исходного мкАт к CD3, оставшегося после рекомбинации, использовали 6% избыток исходных мкАт к PSMA. Затем продукты рекомбинации подвергали диализу против 1×DPBS, pH 7,2, для удаления восстановителя.

Полученные конечные биспецифические антитела вместе с исходными мкАт (т.е. PSMA, CD3 или "Null" (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в табл. 28.

Отобранные подходящие антитела к PSMA также объединяли с неуничтожающим плечом ("Null") для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA (VH с SEQ ID NO: 610, VL с SEQ ID NO: 611) и комбинировали или с плечом к CD3 CD3B219-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3×null), либо с плечами к PSMA, PSMB122, PSMB126, PSMB130 для получения PS3B37, PS3B39 и PS3B40 соответственно (PSMA×null). Эти мкАт с созревшей аффинностью к PSMA скрещивали (как в способах выше) с CD3B219 и CD3B376 для получения биспецифических антител, приведенных в табл. 27.

Таблица 28

Создание биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью, полученных из отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью

ID	Плечо 1	HC	LC	Плечо 2	HC	LC
PS3B60	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B61	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B62	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B63	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B64	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B70	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B71	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B72	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B73	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B74	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B75	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B76	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150

PS3B77	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B78	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B79	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B80	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B81	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B82	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B83	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B84	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B85	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B86	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B90	PSMB365	PSMH865	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150

### 3.2. Оценка биспецифических Ат к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью в связывании клеток LNCAP.

Биспецифические антитела к PSMA×CD3 тестировали на связывание с линией PSMA-положительных клеток, LNCAP, с линией PSMA-отрицательных клеток, PC3. Для оценки возможностей связывания биспецифических антител к PSMA использовали анализ связывания клеток (описанный ранее). Биспецифические антитела нормализовали по концентрации белка, а затем инкубировали с таким же количеством клеток, экспрессирующих PSMA человека или яванского макака. СИФ для каждой концентрации получали с помощью проточной цитометрии и наносили на график в виде функции от концентрации. Данные преобразовывали с помощью  $\log_{10}$  и затем наносили на график. Для определения EC50 строили кривые связывания методом нелинейной регрессии.

Эти относительные значения использовали для ранжирования связывания PSMA с целевыми клетками. На фиг. 14-16 показано связывание всех полученных биспецифических антител с LNCAP. На фиг. 16 ни один из конструкторов не продемонстрировал связывания с линией PSMA-отрицательных клеток. На фиг. 14 и 15 все отобранные соединения с созревшей аффинностью продемонстрировали повышенную аффинность связывания по сдвинутым влево кривым и повышенному  $sM_{max}$  по сравнению с исходным мкАт, PS2B27.

Взаимодействие биспецифических антител с созревшей аффинностью с рекомбинантным ВКД PSMA яванского макака и ВКД PSMA человека изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием системы ProteOn XPR36 (BioRad), как описано ранее для рекомбинантного ВКД PSMA шимпанзе. Все биспецифические антитела связываются с обеими мишенями с по существу одинаковой аффинностью, при этом KD находится в диапазоне от 0,05 нМ до 0,27 нМ для ВКД PSMA человека и от 0,05 до 0,23 нМ для ВКД PSMA яванского макака.

### 3.3. Оценка биспецифических антител с созревшей аффинностью к CD3 и PSMA в анализе функционального уничтожения клеток.

На основании приведенных выше данных, измерений аффинности и идентичности последовательностей три антитела к PSMA, PSMB347, PSMB360 и PSMB365 в качестве биспецифических антител с CD3B219 или CD3B376, были дополнительно охарактеризованы на способность опосредовать PSMA-специфическую перенаправленную цитотоксичность Т-клеток. Опосредованное Т-клетками уничтожение измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки. Замороженные пан CD3+ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие PSMA, (LNCaP, C42) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавок (приобретены у компании Life Technologies).

Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (E:T) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для селекции и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспазы NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела PS3B27 (CD3×PSMA), CD3B288 (CD3×Null) или PS3B46 (PSMA×Null) получали в 2× конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 мин инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на



краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны описания обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые 6 ч, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(ах), содержащей(их) самую высокую концентрацию тестируемого(ых) соединения(ий). Как показано на фиг. 17, кривые для PS3B80, PS3B79, PS3B89, PS3B90, PS3B63 и PS3B72 смещаются влево, что указывает на повышенную активность относительно PS3B27. Как и ожидалось, контрольные антитела с нулевым плечом не индуцировали гибель клеток.

3.4. Противоопухолевая эффективность в предотвращении опухолеобразования ксенотрансплантатов LnCaP у гуманизированных мышей NSG.

Эффективность PS3B79 и PS3B90 оценивали в развившихся ксенотрансплантатах человеческих клеток рака предстательной железы 3D LnCaP AR.TV у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1wj1</sup>/SzJ (NSG), гуманизированных внутрибрюшинно (в/б) Т-клетками человека. PS3B79 и PS3B90 в дозах 2,5 и 5 мг/кг или контрольное антитело Null×CD3B376 вводили каждые 3-4 дня на 36, 39, 43, 47, 50, 53, 56, 60 и 63 дни, всего 8 доз. На 53-й день после имплантации опухоли, который был последней датой исследования, когда в группе оставалось девять (9) животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для PS3B79 в дозе 5 мг/кг с 42% TGI (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони, \* p<0,0001; фиг. 20) и для PS3B90 в дозе 2,5 и 5 мг/кг с 53 и 33%, соответственно, по сравнению с контролем Null×CD3 (двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Бонферрони, \* p<0,001; фиг. 21). Таким образом, CD3B376 способен индуцировать активацию Т-клеток и цитотоксичность *in vivo* и способен приводить к ингибированию роста опухоли в биспецифическом формате с помощью высокоаффинных PSMA-связывающих плеч, PSMB360 и PSMB365.

4. Получение и функциональная оценка биспецифических антител к IL1RAP×CD3.

Моноклональные антитела к IL1RAP, используемые и подходящие для применения в биспецифических антителах по настоящему изобретению, описаны в публикации заявки на патент США № 20170121420 A1, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Пятнадцать моноспецифических антител к IL1RAP (см. табл. 6 в US 20170121420 A1) экспрессировали в виде IgG4, имеющего замены в Fc S228P, L234A и L235A. Исходные мкАт к CD3 были экспрессированы в виде IgG4 с S228P, L234A, L235A, F405L и R409K (нумерация согласно индексу EU). Было также создано моноспецифическое антитело CD3B220 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 92 и VL с SEQ ID NO: 93 и константную область IgG4 с заменами S228P, L234A, L235A, F405L и R409K.

Моноспецифические антитела очищали стандартными методами с использованием колонки с белком А. После элюирования пулы нейтрализовали до pH 7 и диализовали в 1xD-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела к IL1RAP×CD3 получали путем комбинирования моноспецифического мкАт к CD3 (CD3B376: VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661; или CD3B450: VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678) и моноспецифического мкАт к IL1RAP посредством контролируемого обмена Fab-плечами (как описано в WO2011/131746). Вкратце около 1-20 мг/мл при молярном соотношении 1,08: 1 антитела к IL1RAP/CD3 в DPBS, pH 7-7,4 и 75 mM 2-меркаптоэтанолamina (2-MEA) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 ч с последующим удалением 2-MEA посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной фильтрации потока для удаления восстановителя и обеспечения образования биспецифических антител.

Тяжелые и легкие цепи биспецифических антител к IL1RAP×CD3 показаны ниже в табл. 29.

Последовательности CDR 15 мкАт к IL1RAP, выбранных для  
создания биспецифических антител к IL1RAP×CD3 (SEQ ID NO в скобках)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
<b>IAPB47</b>	GYSFTSYW	IYPSDSYT	ARRNSAEN YADLDY	QSISSND	YAS	QQSFTAPL T
	(152)	(153)	(154)	(155)	(156)	(157)
<b>IAPB38</b>	GFTFSNYA	INYGGGS K	AKDYGPFA LDY	QSVDDW	TAS	QQYHHWP LT
	(158)	(159)	(160)	(161)	(162)	(163)
<b>IAPB57</b>	GGSISSSTY Y	IYFTGST	AKEDDSSG YYSFDY	QGISSY	AAS	QQVNSYPL T
	(164)	(165)	(166)	(167)	(168)	(169)
<b>IAPB61</b>	GVSISSTY Y	IYFTGNT	GSLFGDYG YFDY	QFISSN	GAS	QQYNNWP ST
	(170)	(171)	(172)	(173)	(174)	(175)
<b>IAPB62</b>	GYTFNTYA	INTNTGN P	ARRYFDW LLGAFDI	QGISSW	AAS	QQANSFPL T
	(176)	(177)	(178)	(179)	(168)	(180)
<b>IAPB3</b>	GGTFSSYA	ISAIFGTA	ARGNSFHA LWDYAFD Y	QSVLYSSN NKNY	WAS	QQYYSTPL T
	(181)	(182)	(183)	(184)	(185)	(186)
<b>IAPB17</b>	GGTFSSYA	IIPIFGNA	ARTIYLDY VHILDY	QSVLYSSN NKNY	WAS	QQYYSTPL T
	(181)	(187)	(188)	(184)	(185)	(186)
<b>IAPB23</b>	GFTFSNYW	IRYDGGK	AKDAYPPY SFDY	QSVSSY	DAS	QQRSNWPL T
	(189)	(190)	(191)	(192)	(193)	(194)
<b>IAPB25</b>	GFTFSNYA	ISGSGGST	AKGDEYY YDPPLDY	QSISSY	AAS	QQSYSTPL T
	(195)	(196)	(197)	(198)	(168)	(199)
<b>IAPB29</b>	GFTFSNYA	ISGSGGST	AKEWSSYF GLDY	QSISSY	AAS	QQSYSTPL T
	(158)	(196)	(200)	(198)	(168)	(199)
<b>IAPB9</b>	GGTFSSYA	ISPIFGTA	ARRYDNFA RSGDLDY	QSISSY	AAS	QQSYSTPL T
	(181)	(201)	(202)	(198)	(168)	(199)
<b>IAPB55</b>	GVSISSTY Y	IYFTGNT	GSLFGDYG YFDY	QFISSN	GAS	QQYNNWP FT
	(170)	(171)	(172)	(173)	(174)	(203)
<b>IAPB63</b>	GYTFNTYA	INTNTGN	ARRYFDW	SSDVGDYN	DVS	ASYAGNY
		P	LLGAFDI	Y		NVV
	(176)	(177)	(178)	(204)	(205)	(206)
<b>IAPB64</b>	GYTFNTYA	INTNTGN P	ARRYFDW LLGAFDI	SSDVGDYN Y	DVS	SSYAGNYN VV
	(176)	(177)	(178)	(204)	(205)	(207)
<b>IAPB65</b>	GGTFSSYA	ISAIFGTA	ARHLHNAI HLDY	QSVSNF	GAS	QQGKHWP WT
	(181)	(182)	(208)	(209)	(174)	(210)

Последовательности VH и VL для 15 моноклональных антител к IL1RAP показаны ниже в табл. 30.

Последовательности VH и VL для мкАт к IL1RAP  
для создания биспецифических антител к IL1RAP×CD3

ID	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
<b>IAPB4</b> 7	EVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIYPSDSY TRYSPSFQQTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYCY ARRNSAENYADLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGSPVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQ DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	211	EIVLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQISNDLNWYQ QKPGKAPKLLIYYASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLQPEDFATYYCQQSFT APLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	212
<b>IAPB3</b> 8	EVQLLESGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVSGINYGG GSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDYGPFALDYWGQG	213	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVDDWLAWY QQKPGQAPRLLIYTASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQY HHWPLTFGQGTKVEIKRT	214

	<p>TLVTVSSASTKGPSVFPLAP  CSRSTSESTAALGCLVKDYF  PEPVTVSWNSGALTSGVHT  FPAVLQSSGLYSLSSVTVV  SSSLGTKTYTCNVVHDHKPSN  TKVDKRVESKYGPPCPPCP  APEAAGGPSVFLFPPKPKDT  LMISRTPEVTCVVVDVDSQE  DPEVQFNWYVDGVEVHNA  KTKPREEQFNSTYRVVSVL  TVLHQDWLNGKEYKCKVNS  NKGLPSSIEKTISKAKGQPR  EPQVYITLPPSQEEMTKNQV  SLTCLVKGFPYPSDIAVEWES  NGQPENNYKTTPPVLDSDG  SFFLYSRLTVDKSRWQEGN  VFSCSVMHEALHNHYTQKS  LSLSLGK</p>		<p>VAAPSVFIFPPSDEQLKSG  TASVVCLLNNFYPREAKV  QWKVDNALQSGNSQESV  TEQDSKDSSTYLSSTLTLS  KADYEEKHKVYACEVTHQ  GLSSPVTKSFNRGEC</p>	
<b>IAPB5 7</b>	<p>QLQLQESGPGLVKPKSETLSL  TCTVSGGSISSSTYYWGWR  QPPGKGLEWIGSIYFTGSTD  YNPSLKSRSVISVDTSKNQF  SLKLSVTAADTAVYYCAK  EDDSSGYYSFDYWGQGNL  VTVSSASTKGPSVFPLAPCS  RSTSESTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFP  AVLQSSGLYSLSSVTVVPS  SLGTKTYTCNVVHDHKPSNTK  VDKRVESKYGPPCPPCPAPE  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVDSQEDPE  VQFNWYVDGVEVHNAKTK  PREEQFNSTYRVVSVLTVL  HQDWLNGKEYKCKVSNKGL  LPSSIEKTISKAKGQPREPQV  YITLPPSQEEMTKNQVSLTCL  LVKGFYPSDIAVEWESNGQP  PENNYKTTPPVLDSDGSFFL  YSRLTVDKSRWQEGNVFSC  SVMHEALHNHYTQKSLSLS  LGK</p>	215	<p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRV  TITCRASQGISSYLAWYQ  QKPGKAPKLLIYAASATLQ  SGVPSRFSGSGSGTEFTLT  ISSLQPEDFATYYCQQVN  SYPLTFGGGTKEIKRTV  AAPSVFIFPPSDEQLKSGT  ASVVCLLNNFYPREAKVQ  WKVDNALQSGNSQESVTE  EQDSKDSSTYLSSTLTLSK  ADYEEKHKVYACEVTHQ  LSSPVTKSFNRGEC</p>	216
<b>IAPB6 1</b>	<p>QLQLQESGPGLVKPKSETLSL  TCTVSGVSISSSTYYWGWL  RQPPGMGLEWTGSIYFTGN  TYYNPSLKSRTVISVDTSRN  QFSLKLSVTAADTAVYYC  GSLFGDYGYFDYWGQGTLS  VTVSSASTKGPSVFPLAPCS  RSTSESTAALGCLVKDYFPE</p>	217	<p>EIVMTQSPATLSVPPGERA  TLSCRASQFISSNLAWYQ  QKPGQAPRLLIYGASTRA  TGIPARFSGSGSGTDFTLTI  SSLQSEDFAVYYCQQYNN  WPSITFGPGTKVDIKRTVA  APSVFIFPPSDEQLKSGTA  SVVCLLNNFYPREAKVQ</p>	218

	PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLVVTVPPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDRVESKYGPPCPPCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEVVESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK		WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
<b>IAPB6 2</b>	QVQLVQSGSELKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYLSLVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYYCQQA NSFPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	220
<b>IAPB3</b>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARGNSFHALWDYAFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYLSLVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHK	221	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLKADYEKHKVYA	222

	<p>PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK</p>		<p>CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>	
<b>IAPB1</b> 7	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAIWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGN ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARTIYLDYVHILDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNV DHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPP PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK</p>	223	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDFRFGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>	222
<b>IAPB2</b> 3	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYWMNWV RQAPGKGLEWVSAIRYDGG SKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLR AEDTAV YYCAKDAYPPYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNV DHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPP PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD</p>	224	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCVLLNFPY PREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC</p>	225

	TLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
<b>IAPB2 5</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLR  LSCAASGFTFSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGEYYYPDPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVYS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDS SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	226	DIQMTQSPSSLSASVGDR  VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCVLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227
<b>IAPB2 9</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLR  LSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKEWSSYFGLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA	228	DIQMTQSPSSLSASVGDR  VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVCVLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227

	KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK			
<b>IAPB9</b>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGWISPIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDNAVYY CARRYDNFARSGDLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPYTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTKYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCVMHEALHNHYT QKLSLSLGK	229	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSSSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGGQTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227
<b>IAPB5</b> 5	QLQLQESGGLVVKPSETLSL TCTVSGVSISSSTYYWGWL RQPPGMGLEWTGSIYFTGN TYYNPSLKSRTISVDTSRN QFSLKLSVTAADTAVYYC GSFLGDYGYFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV	633	EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQFISSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNN WPFTFGPGHCVDIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	230



	YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLG LGK			
<b>IAPB6</b> <b>3</b>	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWW RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNV DHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVG DYNVVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEAIYFCA SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	231
<b>IAPB6</b> <b>4</b>	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWW RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNV DHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVG DYNVVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEAIYFCS SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	232

	WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
<b>IAPB6 5</b>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARHLHNAIHLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVYTVPS SSLGTKTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDLAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	233	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNFLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQGKH WPWTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKSDSTYLSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	234

#### 4.1. Оценка биспецифических антител к IL1RAP в анализе цитотоксичности Т-клеток цельной крови.

Способы. Линию опухолевых клеток LAMA-84 промывали DPBS, после чего инкубировали с CFSE (ресуспендировали в 150 мкл DMSO и разводили 1:10000) при концентрации  $10 \times 10^6$  клеток/мл CFSE в течение 8 мин при комнатной температуре. Реакцию окрашивания гасили HI FBS и промывали в среде перед ресуспендированием в полной среде при  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Равные объемы цельной крови и опухолевых клеток, окрашенных CFSE, объединяли в каждой лунке 96-луночного планшета. После добавления антитела (ресуспендированного в 10 мкл DPBS) в соответствующие лунки все планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Неразбавленный CD25-PE добавляли непосредственно в каждую лунку цельной крови и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, защищая от света. Затем клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин и лизировали 200 мкл буфера для лизиса эритроцитов разных видов, повторяли еще 4 раза. Клетки однократно промывали DPBS и окрашивали Live/Dead Near-IR (разведенными в DPBS) в течение 15 мин (табл. 31). Каждую лунку промывали и ресуспендировали в буфере для FACS перед проведением BD FACS CANTO II.

Таблица 31

Панель окрашивания цитотоксичности Т-клеток цельной крови

Антиген	Канал	Клон	Разведение	Источник	№ по каталогу
CD25	PE	BC96	1:100	Biologend	302606
CD4	PerCP	RPA-T4	1:100	Biologend	300528
CD8	APC	HIТ8a	1:100	Biologend	300912
Live/Dead	APC-Cy7	Н/П*	1:200	Invitrogen	L34976

Н/П=не применимо.

Количество клеток на FACS CANTO II (Becton, Dickinson and Company, Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси) ограничивали  $1 \times 10^4$  опухолевыми клетками. Гибель опухолевых клеток оценивали путем гейтирования по FSC и SSC для идентификации популяций клеток, затем по CFSE-положительным опухолевым событиям и, наконец Live/Dead Near-IR для оценки цитотоксичности опухоли. Активацию Т-клеток оценивали путем гейтирования по FSC и SSC для идентификации популяций клеток, CFSE-отрицательных событий, Near-IR-отрицательных событий для оценки живых клеток, а затем CD25-положительных клеток. Процент мертвых опухолевых клеток или CD25-положительных клеток был нанесен на график с помощью GraphPad Prism 6 и проанализирован с использованием нелинейной кривой. Дополнительный статистический анализ был проведен в программе "R" для определения значений EC<sub>50</sub> в популяции с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами.

Результаты, чтобы имитировать физиологические состояния периферической цельной крови, содержащей sIL1RAP, IC3B19 (IAPB57×CD3B219) и IC3B34 (IAPB57×CD3B376) оценивали в анализе перенаправления Т-клеток ex vivo с использованием цельной крови. Экзогенно добавленную линию

клеток IL1RAP+ LAMA-84 ( $2 \times 10^4$  клеток/лунку) добавляли к здоровой контрольной периферической цельной крови человека ( $n=15$  донорских образцов) с IC3B19, IC3B34 и контрольными биспецифическими антителами с нулевым плечом в течение 48 ч. Как показано на фиг. 52, IC3B19 и IC3B34 индуцировали аналогичную опосредованную Т-клетками цитотоксичность линии клеток IL1RAP+ LAMA-84 ex vivo через 48 ч. Значения  $EC_{50}$  для цитотоксичности IC3B19 и IC3B34, представленные на фиг. 52, составляли 2,097 и 2,762 соответственно (табл. 32). Аналогично значения  $EC_{50}$  для активации Т-клеток (CD25) IC3B19 и IC3B34, представленные на фиг. 53, составляли 4,237 и 7,825 нМ соответственно (табл. 33). Все контрольные биспецифические антитела с нулевым плечом не индуцировали определяемых уровней цитотоксичности или активации Т-клеток, как показано на фиг. 52 и 53. Общий уровень цитотоксичности и активации Т-клеток был одинаковым как для IC3B19, так и для IC3B34.

Таблица 32

Концентрации  $EC_{50}$  (нМ) цитотоксичности IC3B19 и IC3B34 в клеточной линии LAMA-84

Эффективная концентрация (нМ)	IC3B19	IC3B34
$EC_{50}$	2,097	2,762

Таблица 33

Концентрации  $EC_{50}$  (нМ) активации Т-клеток IC3B19 и IC3B34 в клеточной линии LAMA-84

Эффективная концентрация (нМ)	IC3B19	IC3B34
$EC_{50}$	4,237	7,825

4.2. Оценка высвобождения цитокинов биспецифическими антителами к IL1RAP×CD3 в анализе цитотоксичности Т-клеток цельной крови через 24 и 48 ч.

Способы. Замороженные супернатанты 24- и 48-часовых образцов из примера 4-1 размораживали на жидком льду. Перед использованием планшеты центрифугировали при 500 g в течение 5 мин при 4°C, затем снова помещали на жидкий лед. Последовательные разведения готовили в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Falcon) с использованием MSD Diluent 2 с соотношениями разведений 1:2, 1:25 и 1:1000 для ИФА.

Во время центрифугирования супернатантов планшеты для анализа MSD (ProInflammatory Panel I V-Plex, кат. № K15049G-4, номер партии K008572) предварительно промывали в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую подготавливали путем восстановления полученного калибратора в 1,0 мл MSD Diluent 2. Пятьдесят микролитров каждого образца или стандарта добавляли непосредственно в предварительно промытые планшеты MSD. Последующие инкубации и промывки проводили в соответствии с протоколом производителя. Планшеты для анализа считывали на MSD Sector Imager.

Для сравнения ответа IC3B19 и IC3B34 использовались два способа.

Линейная регрессия со смешанными эффектами.

В этом способе была построена модель линейной регрессии с фиксированными эффектами для соединения, дозы и соединения посредством взаимодействия доз и случайных эффектов, которые учитывают объединенных доноров. Затем были проведены апостериорные сравнения между IC3B19 и IC3B34 для каждой концентрации, и  $r$ -значения были соответствующим образом скорректированы для множественных сравнений.

Нелинейная (четырёхпараметрическая) регрессия со смешанными эффектами IC3B19 и IC3B34 были смоделированы вместе с использованием модели нелинейной регрессии с фиксированными параметрами эффекта для минимума, максимума,  $\log EC_{50}$  и угловой коэффициент для каждого соединения, а также со случайным эффектом, который учитывает эффект объединенных доноров. Точечные оценки и их доверительные интервалы были извлечены и нанесены на график для визуального сравнения из этих отдельных моделей. Тестирование значительных различий для каждого параметра проводили путем построения модели, в которой использовали совместную оценку представляющего интерес параметра, а затем сравнивали эту модель с исходной моделью с использованием критерия логарифмического правдоподобия. Для усовершенствования существует модель с параметрами для минимума IC3B19, максимума IC3B19, IC3B19  $\log EC_{50}$ , углового коэффициента IC3B19, минимума IC3B34, максимума IC3B34, IC3B34  $\log EC_{50}$  и IC3B34. чтобы проверить, существенно ли отличаются минимумы, строится вторая модель, которая имеет все те же параметры, за исключением того, что для минимума существует единственный общий параметр. Логарифмическое правдоподобие (общая мера того, насколько хорошо модель соответствует данным) первой модели сравнивается с логарифмическим правдоподобием второй модели. Если они существенно не отличаются друг от друга, то можно сделать вывод, что минимумы существенно не отличаются друг от друга. Точно так же, если логарифмические вероятности значительно отличаются друг от друга, мы можем заключить, что минимальные значения существенно отличаются.

В ряде случаев модели или сравнения параметров были неопределимы по одной из двух причин:

1) данные были слишком сложными для расчета самой четырёхпараметрической логистической

регрессии, или 2) разница между оценками параметров была настолько большой, что это привело к сбою объединенной модели. В первом случае результаты не сообщаются, и в сводной таблице они обозначаются "Н/Д". Во втором случае результаты также не сообщаются, но они обозначены в сводной таблице как "знач.", как сокращение для значимого. Поскольку 95% доверительные интервалы вокруг этих параметров оцениваются отдельно и не перекрываются, мы можем считать их существенно разными, но точное р-значение неизвестно.

Различия считаются статистически значимыми при р-значении, меньшем или равном 0,05. Все анализы выполняли в R версии 3.3.2.

Результаты. IC3B19 и IC3B34 опосредованное вовлечение Т-клеток и линии IL1RAP+ клеток-мишеней LAMA-84 (эндогенные и экзогенно добавленные опухолевые клетки) приводило к высвобождению цитокинов Т-клетками. чтобы определить разницу в высвобождении цитокинов между IC3B19 и IC3B34, супернатанты оценивали в анализах на 10 провоспалительных цитокинов из цельной крови (n=15 доноров), цитотоксичность и активацию Т-клеток с добавлением экзогенной линии опухолевых IL1RAP+ клеток LAMA-84, как обсуждается в разделе пример 1. Из 10 проанализированных цитокинов большинство цитокинов приводило к измеримому дозозависимому высвобождению в ответ как на IC3B19, так и на IC3B34, за исключением ИЛ-8 и ИЛ-12p70. Как показано в табл. 34, ИЛ-10, ИЛ-2, ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  приводили к наиболее сильному высвобождению EC50 (нМ). Кроме того, большинство цитокинов и в обеих временных точках, молекула IC3B34 приводила к менее высокой EC50 (нМ), которая была статистически значимой. Исключением были ИЛ-4 (24 ч), ИЛ-6 (24 и 48 ч), ИЛ-8 (24 и 48 ч), ИЛ-12p70 (24 и 48 ч), ИЛ-13 (24 ч), ИФН- $\gamma$  (24 и 48 ч) и ФНО- $\alpha$  (24 ч), которые не имели статистически значимой разницы в значениях EC50 (нМ) между IC3B19 и IC3B34.

Таблица 34

Сводная таблица четырехпараметрической логистической регрессии IC3B19 и IC3B34

Цитокин	№ Фиг.	Эксперимент	Угловой коэффициент	Минимум	Максимум	
		т	EC50	т	м	
НЕК-1-бета	Фиг. 37	24 часа	<b>0,0027</b>	0,3046	<b>0,0268</b>	0,2033
НЕК-1-бета	Фиг. 38	48 часов	<b>0,0010</b>	0,3951	0,2543	0,0528
ИЛ-2	Фиг. 39	24 часа	<b>0,0001</b>	<b>0,0256</b>	0,3103	0,6466
ИЛ-2	Фиг. 40	48 часов	<b>знач.</b>	0,2079	0,0158	<b>0,0008</b>
ИЛ-4	Фиг. 41	24 часа	0,2415	0,4668	0,2942	<b>0,0043</b>
ИЛ-4	Фиг. 42	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-6	Фиг. 43	24 часа	<b>знач.</b>	0,0819	0,1151	0,5224
ИЛ-6	Фиг. 44	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-8	Фиг. 45	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-8	Фиг. 46	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-10	Фиг. 47	24 часа	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0010</b>	0,3406	0,7036
ИЛ-10	Фиг. 48	48 часов	<b>&lt; 0,0001</b>	0,2702	<b>0,0011</b>	<b>0,0004</b>
ИЛ-12p70	Фиг. 49	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-12p70	Фиг. 50	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-13	Фиг. 51	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-13	Фиг. 52	48 часов	<b>0,0106</b>	0,8268	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
ИФН-гамма	Фиг. 53	24 часа	<b>0,0065</b>	0,6920	0,4644	0,3179
ИФН-гамма	Фиг. 54	48 часов	<b>0,0266</b>	0,1678	0,2695	<b>0,0319</b>
ФНО-альфа	Фиг. 55	24 часа	<b>0,0016</b>	<b>0,0128</b>	0,1443	0,7895
ФНО-альфа	Фиг. 56	48 часов	<b>0,0004</b>	0,5553	<b>0,0043</b>	0,5216

Полужирным шрифтом обозначена статистически значимая разница в значениях EC50 (нМ) между IC3B19 и IC3B34. Результаты экспериментов по высвобождению отдельных цитокинов показаны на указанных фигурах.

#### 4.3. Оценка биспецифических антител к IL1RAP в анализе цитотоксичности каспаз.

Опосредованное Т-клетками уничтожение IC3B19 и IC3B34 измеряли с применением анализа клеточной токсичности второго типа. Анализ цитотоксичности каспазы косвенно измеряет гибель клеток через расщепление флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно

визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру.

Замороженные пан CD3+ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки-мишени (клетки NCI-H1975, линия клеток аденокарциномы легкого человека, экспрессирующая IL1RAP) культивировали в среде RPMI 1640/Glutamax (25 mM буфер HEPES) с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS, 1 mM пирувата натрия и 0,1 mM заменимых аминокислот (Life Technologies).

Клетки-мишени высевали из расчета 20000 клеток/лунку в 50 мкл среды RPMI, не содержащей фенолового красного, содержащей добавки, за 16 ч до начала эксперимента в обработанные культурой ткани прозрачные планшеты с плоским дном (Costar). Клетки инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 20 мин, чтобы обеспечить равномерное распределение клеток в лунках, а затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи.

В день эксперимента Т-клетки подсчитывали и разводили до  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в среде RPMI без фенола красного, содержащей добавки, и объединяли с субстратом каспазы-3/7 Nuc-View TM488 (Essen Biosciences) для получения рабочей концентрации 10 мкМ. В каждую лунку добавляли по 100 мкл объединенных Т-клеток и субстрата каспазы-3/7 с конечной концентрацией 5 мкМ субстрата каспазы-3/7.

Биспецифические антитела IC3B19 (IAPB57×CD3B219), IC3B34 (IAPB57×CD3B376), CD3B288 (Null×CD3B219), и IAPB57×Null (IAPB101) получали в 4-кратной конечной концентрации в среде RPMI без фенолового красного, содержащей добавки и 50 мкл антител были добавлены в каждую лунку. После 20-минутной инкубации при комнатной температуре для равномерного распределения в лунках планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Описание обработки на Incucyte было разработано для клеток NCI-H1975. Это описание обработки четко идентифицирует каспазную активность клеток-мишеней, при этом исключая Т-клетки по размеру. Измерения проводились в ТО и каждые 6 ч в течение периода до 120 ч. Максимальный сигнал был определен через 72 ч после обработки, когда данные были проанализированы.

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием описания обработки NCI-H1975. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в виде зависимости Log<sub>10</sub> концентраций антител в нМ. EC<sub>50</sub> для каждой кривой концентрация-ответ в наномоль/л (нМ) регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная кривая "доза-ответ" с переменным угловым коэффициентом). Каждый анализ включал две технических повторности и четыре измерения в каждой технической повторности.

И IC3B19, и IC3B34, но не биспецифические антитела с нулевыми плечами (IAPB57XB23B49 или B23B39×CD3B219), индуцировали мишень-специфическую цитотоксичность в клетках NCI-H1975 (фиг. 56). В этом анализе цитотоксичность EC<sub>50</sub> варьируется в пределах трех раз для IC3B19 и IC3B34, при этом значения составляют 0,018 и 0,057 нМ соответственно.

4.4. Эффективность IAPB57×CD3B376 в ксенотрансплантатах человеческих клеток нМРЛ Н1975 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG.

Эффективность биспецифического антитела к IC3B34 IAPB57×CD3B376 оценивали на развившихся ксенотрансплантатах немелкоклеточного рака легкого (нМРЛ) человека Н1975 у самок мышей NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtmlWjl/SzJ (NSG), гуманизированных человеческими Т-клетками. IAPB57×CD3B376 в дозе 0,1, 0,35 или 1 мг/кг или контрольное антитело Null×CD3 вводили на 14, 18, 21 и 25 дни, всего 4 дозы. На 29-й день после имплантации опухоли, который был последней датой исследования, когда в группе оставалось десять животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали с IAPB57×CD3B376 в дозе 0,35 и 1 мг/кг с 63 и 89% TGI, соответственно, по сравнению с контролем Null×CD3 (двусторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони,  $p < 0,0001$ , фиг. 57).

## 5. Антитела к CD33.

### 5.1. Создание антигенов.

Белки CD33 человека и яванского макака получали с или без мутированной мономерной формы человеческого сывороточного альбумина (HSA), Uniprot P02768 с мутацией C58S, слитой на С-конце для иммунизаций и анализов. кДНК, кодирующие антигены белка CD33 с шестигистидиновой меткой (SEQ ID NO: 596), синтезировали и клонировали в вектор экспрессии для секреции у млекопитающих под управлением промотора актина с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Внеклеточный домен (ВКД) полноразмерного CD33 человека, полученный из Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 235) (ВКД CD33 человека), сливали на N-конце с сигнальной последовательностью и с HSA или без нее, после чего следовала шестигистидиновая метка (SEQ ID NO: 596) на С-конце, (ВКД hCD33 с

HSA и только ВКД hCD33). Конструкт, экспрессирующий CD33 человека, временно трансфицировали в клетки, полученные из HEK 293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific; г. Уолтем, штат Массачусетс, США) с использованием ExpiFectamine в соответствии с протоколом производителя. Перед сбором клетки инкубировали в течение 5 дней при 37°C в атмосфере с 8% CO<sub>2</sub> на орбитальном шейкере. Экспрессирующие клетки удаляли центрифугированием и растворимый CD33 очищали из среды с использованием афинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла с использованием смолы Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare; г. Масс-Чалфонт, Великобритания) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) Superdex 200 (GE Healthcare) в фосфатно-солевом буфере Дульбекко, pH 7,2 (1× DPBS). Элюированные фракции SEC, за исключением любых дисульфидных агрегатов, объединяли и стерилизовали фильтрованием, чтобы получить конечный белок для иммунизации и анализов CD33. Концентрацию белка определяли путем измерения при длине волны A280, а качество очищенного белка оценивали методом ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной хроматографии (Phenomenex; г. Торранс, штат Калифорния). Измерения уровней эндотоксина проводили с использованием кассет EndoSafe-PTS, хромогенного LAL-теста (Charles River; г. Уилмингтон, штат Массачусетс).

Человеческие белки субдомена ВКД CD33, V-домен hCD33 с HSA, V-домен hCD33 с His, C2-домен hCD33 с HSA и C2-домен hCD33 с His конструировали, экспрессировали и очищали в виде ВКД полноразмерного человеческого CD33.

Конструкты CD33 яванского макака для анализов иммунизации и перекрестной селективности, ВКД CD33 яванского макака с HSA, CD33 яванского макака с His, также были созданы на основе последовательности Genbank XP005590138.1. Экспрессия и очистка белка CD33 яванского макака были такими же, как и для белков CD33 человека.

Антигены CD33 для скрининга биотинилировали в 50 мМ натрий фосфата при pH 7,2 с использованием набора SureLink Chromagenic Biotin Labeling (SeraCare KPL) в соответствии с условиями производителями. Вкратце к белку CD33 добавляли исходный раствор биотина с концентрацией 25 мМ в молярном соотношении 4:1 биотина к белку и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при осторожном вращении, а затем переводили его на температуру 4°C и инкубировали в течение еще 2 ч. Невключенный биотин удаляли путем замены буфера на 1×DPBS. Концентрацию белка и включение биотина определяли путем измерения при длине волны A28 и A354 нМ с использованием прибора NanoDrop. Последовательности каждого из антигенов, описанных выше, приведены в табл. 35.

Таблица 35

Последовательности антигена

Название белка	ID белка	SEQ ID NO
ВКД CD33 яванского макака с HSA	C33W1	236
ВКД CD33 человека с HSA	C33W2	237
V-домен CD33 человека с HSA	C33W3	238
C2-домен CD33 человека с HSA	C33W4	239
V-домен CD33 человека с His	C33W8	240
C2-домен CD33 человека с His	C33W9	241
ВКД CD33 человека с His	C33W49	242
ВКД CD33 яванского макака с His	C33W50	243
CD33 человека, полноразмерный		244
CD33 яванского макака, полноразмерный		245

#### 5.2. Создание изогенных линий клеток, экспрессирующих CD33.

Линии клеток, экспрессирующие CD33 человека и яванского макака, получали с использованием лентивируса (Genecoreia; г. Роквилл, штат Мэриленд, США), содержащего полноразмерный CD33 человека или CD33 яванского макака и пурамицин для селекции CD33-положительных клеток. Клетки HEK293F (ATCC), отрицательные по CD33, трансдуцировали лентивирусными частицами для сверхэкспрессии CD33 человека и CD33 яванского макака. После трансдукции клетки, положительно экспрессирующие CD33 и маркер устойчивости, отбирали путем обработки объединенных клеток, выращенных в DMEM+10% HI FBS (Life Technologies; г. Карлсбад, штат Калифорния) с добавлением различных концентраций пурамицина (Life Technologies).

Кроме полученных с помощью HEK линий клеток, для анализов связывания и клеточной токсичности использовали несколько коммерческих линий клеток. Они включали MOLM13, KG1, SH2, OCIAML3 и MV411 и были получены или из Американской коллекции типовых культур, или из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, и культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в полной культуральной среде RPMI с 10% FBS.

### 5.3. Кампании иммунизации.

#### OmniRat.

Линию трансгенных крыс, синтезирующих человеческий иммуноглобулин (OmniRat®; Ligand Pharmaceuticals; г. Сан-Диего, штат Калифорния), использовали для создания клеток гибридомы, экспрессирующей моноклональное антитело к CD33 человека. Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V<sub>HS</sub>, все человеческие сегменты D и J<sub>H</sub> в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C<sub>H</sub>), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V<sub>ks</sub>, связанных с J<sub>k</sub>-C<sub>k</sub>, и 16 V<sub>ls</sub>, связанных с J<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>) (см., например, Osborn et al. (2013), J. Immunol., 190(4):1481-1490). Соответственно крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации с образованием высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в публикации PCT WO 2014/093908, составленной Bruggemann et al.

При иммунизации рекомбинантным CD33 человека и яванского макака (ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA соответственно) эта трансгенная крыса продуцирует химерные крысиные/человеческие антитела IgG к человеческому CD33, некоторые из которых также связываются с CD33 яванского макака.

Восемь крыс OmniRat иммунизировали попеременно ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. После 46-дневного режима иммунизации лимфатические узлы всех восьми OmniRat собирали и использовали для создания гибридом. Восемьдесят один 96-луночный планшет с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA с использованием стандартных методик, из которых отбирали супернатанты 128 гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Большинство из 128 супернатантов также были положительными в отношении связывания с клетками, сверхэкспрессирующими huCD33 или cyCD33.

Шесть дополнительных OmniRat иммунизировали только ghuCD33. После 31-дневного режима иммунизации лимфатические узлы всех шести OmniRat собирали и использовали для создания гибридом. Тридцать 96-луночных планшетов с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA с использованием стандартных методик, из которых отбирали 94 супернатанта гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Лизаты гибридом получали из положительных клонов и готовили к клонированию V-области, как описано ниже.

#### OmniMouse.

Линию трансгенных мышей, синтезирующих человеческий иммуноглобулин (OmniMouse®; Ligand Pharmaceuticals), использовали для создания гибридомных клеток, экспрессирующей моноклональное антитело к CD33 человека. OmniMouse® содержит химерные человеческие/крысиные локусы IgH вместе с полностью человеческими локусами IgL. Мыши демонстрируют сниженную экспрессию мышинового иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями.

При иммунизации рекомбинантным CD33 человека и яванского макака (ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA соответственно) эта трансгенная мышь продуцирует химерные крысиные/человеческие антитела IgG к человеческому CD33, некоторые из которых также связываются с CD33 яванского макака.

Четыре OmniMouse иммунизировали попеременно ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. После 53-дневного режима иммунизации собирали селезенки и лимфатические узлы от всех четырех OmniMouse и использовали их для создания гибридом. Сорок восемь 96-луночных планшетов с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA, из которых отбирали 8 супернатантов гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Лизаты гибридом получали из положительных клонов и готовили к клонированию V-области, как описано ниже.

#### Клонирование V-области.

Общую РНК из лизатов клеток гибридомы очищали с помощью набора RNeasy 96 (Qiagen; г. Хилден, Германия) в соответствии с протоколом производителя, и полученную РНК количественно определяли с помощью системы Drop Sense и хранили при -80°C, или кДНК синтезировали с использованием Superscript III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦП (Invitrogen; г. Карлсбад, штат Калифорния). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров, отожженных с константными областями тяжелых, каппа-и ламбда-цепей соответственно. Реакционная

смесь для ОТ-ПЦР содержит до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси dNTP, реакционного буфера, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мкл, Invitrogen) и Superscript™ III RT (200 Ед/мкл, Invitrogen, кат. № 18080-051) и инкубируется при 50°C в течение 50 мин и 85°C в течение 5 мин. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20°C или одноцепочечную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР. Реакцию ПЦР проводили с использованием полимеразы Platinum Pfx (Invitrogen). Фрагменты v-области амплифицировали путем отжига прямого и обратного праймеров с лидерными последовательностями и константными областями тяжелой, капша-и лямбда-цепей, соответственно, с использованием оптимизированных условий ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты прогоняли в геле и секвенировали с использованием предварительно разработанных праймеров для получения последовательностей v-области. Полученные файлы в формате abi для последовательностей v-областей собирали и анализировали с помощью программы анализа последовательностей v-областей по Сенгер, созданной в Janssen Biologics Discovery. Последовательности аминокислот выделенных v-областей записывали во внутренней базе данных, оптимизировали кодоны и клонировали в вектор экспрессии на основе pUnderm, несущий соответствующую константную область желаемого изотипа человеческого антитела: IgG1 F405L и IgG4 PAA. В общей сложности 76 антител OMNIRat и 8 антител OMNIMouse были успешно клонированы и отправлены для дальнейшей характеристики. В таблицах ниже приведены последовательности из 32 первых последовательностей, идентифицированных в процедурах с OMNIRat (см. табл. 36), и 8 последовательностей, идентифицированных в процедуре OMNEVouse (см. табл. 37) с несколькими антителами OMNIRat, клонированными в IgG1, а также в IgG4 PAA, а все последовательности из процедур с OMNEVouse клонировали как в IgG1, так и в IgG4 PAA.

Таблица 36

Последовательности антител, идентифицированные  
 посредством иммунизации CD33 у крыс OMNIRat

мкАт	ID HC	Изотип HC	ID LC
C33B46	C33H108	hulgG1F405L	C33L74
C33B48	C33H80	hulgG1F405L	C33L73
C33B52	C33H42	hulgG1F405L	C33L8
C33B54	C33H44	hulgG1F405L	C33L10
C33B55	C33H45	hulgG1F405L	C33L11
C33B56	C33H46	hulgG1F405L	IAPL24
C33B61	C33H48	hulgG1F405L	C33L58
C33B62	C33H49	hulgG1F405L	C33L59
C33B63	C33H51	hulgG1F405L	C33L34
C33B64	C33H52	hulgG1F405L	N46L109
C33B66	C33H55	hulgG1F405L	C33L42
C33B72	C33H65	hulgG1F405L	C33L47
C33B73	C33H66	hulgG1F405L	C33L60



C33B75	C33H70	hulgG1F405L	N46L109
C33B77	C33H72	hulgG1F405L	C33L40
C33B79	C33H74	hulgG1F405L	C33L38
C33B80	C33H76	hulgG1F405L	C33L39
C33B82	C33H78	hulgG1F405L	C33L57
C33B83	C33H81	hulgG1F405L	C33L53
C33B87	C33H87	hulgG1F405L	C33L35
C33B88	C33H88	hulgG1F405L	C33L61
C33B89	C33H90	hulgG1F405L	C33L51
C33B94	C33H98	hulgG1F405L	C33L69
C33B95	C33H98	hulgG1F405L	IAPL24
C33B96	C33H99	hulgG1F405L	C33L37
C33B101	C33H69	hulgG1F405L	C4LL152
C33B107	C33H68	hulgG1F405L	C33L17
C33B120	C33H87	hulgG1F405L	C33L41
C33B122	C33H92	hulgG1F405L	C33L30
C33B123	C33H91	hulgG1F405L	C33L44
C33B124	C33H73	hulgG1F405L	C33L32
C33B125	C33H84	hulgG1F405L	C33L66
C33B760	C33H45	huIgG4 PAA	C33L11
C33B777	C33H65	huIgG4 PAA	C33L47
C33B778	C33H66	huIgG4 PAA	C33L60
C33B782	C33H72	huIgG4 PAA	C33L40
C33B792	C33H87	huIgG4 PAA	C33L35
C33B799	C33H98	huIgG4 PAA	C33L69
C33B806	C33H69	huIgG4 PAA	C4LL152
C33B830	C33H84	huIgG4 PAA	C33L66
C33B836	C33H80	huIgG4 PAA	C33L73
C33B937	C33H66	huIgG4 PAA	C33L132

HC: тяжелая цепь;

LC: легкая цепь

Таблица 37

Последовательности антител, идентифицированные  
 посредством иммунизации CD33 у OMNIMouse

мкАт	ID HC	ID LC
C33B901	C33H249	C33L115
C33B902	C33H250	C33L116
C33B903	C33H251	C33L117

C33B904	C33H252	C33L118
C33B905	C33H253	C33L119
C33B906	C33H254	C33L120
C33B907	C33H255	C33L121
C33B908	C33H256	C33L122
C33B909	C33H249	C33L115
C33B910	C33H250	C33L116
C33B911	C33H251	C33L117
C33B912	C33H252	C33L118
C33B913	C33H253	C33L119
C33B914	C33H254	C33L120
C33B915	C33H255	C33L121
C33B916	C33H256	C33L122

НС: тяжелая цепь;

LC: легкая цепь.

#### 5.4. Трансфекция Expi293 и очистка в малых масштабах.

Антитела, идентифицированные в кампаниях иммунизации и последующем клонировании V-области (в IgG1 F405L и IgG4 PAA), экспрессировали и очищали в небольшом масштабе 2 мл. Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью  $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл в среду для экспрессии Expi293 и культивировали в поликарбонатных, одноразовых, стерильных, вентилируемых, встряхиваемых колбах Эрленмейера без дефлекторов в шейкере-инкубаторе при 37°C, 7% CO<sub>2</sub> (INFORS HT Multitron Pro). Для стандартного роста клеток во встряхиваемых колбах объемом 125 мл-2 л, скорость встряхивания устанавливали на 130 об/мин для шейкеров с диаметром встряхивания 19 мм. Клетки пересеивали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при  $3 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью  $3 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Для оптимальной трансфекции используют стерильную плазмидную ДНК тяжелой и легкой цепей в концентрации 0,1 мг/мл в буфере TE (10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТК, pH 8,0).

Клетки Expi293 трансфицировали в соответствии с протоколом трансфекции производителя (публикация ThermoFisher № MAN0007814). Трансфекцию проводили в 24-луночных планшетах с глубокими лунками (GE Healthcare). Вкратце плазмидную ДНК разводили 0,1 мл среды OptiMEM™ (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,250 мкг ДНК тяжелой цепи: 0,750 мкг ДНК легкой цепи: 0,5 мкг pAdvantage. 5 мкл реагента для трансфекции ExpiFectamine 293 разбавляли и осторожно перемешивали с 95 мкл среды OptiMEM™ и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamine™ 293 добавляли к разбавленной ДНК, осторожно перемешивали, а комплексы ExpiFectamine 293/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 40 мин. После инкубации к комплексам, инкубированным в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37°C и при 7% CO<sub>2</sub> добавляли 1,8 мл клеток Expi293™.

Через 1 день после трансфекции добавляли 10 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 Enhancer 1 и 100 мкл реагента ExpiFectamine 293™ Enhancer 2 и возвращали планшеты в инкубатор еще на 5 дней. Культуру собирали на 6 день после трансфекции путем центрифугирования при 850×g в течение 15 мин перед очисткой.

1,7 мл Осветленных экспрессионных супернатантов, приготовленных, как описано выше, переносили в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками объемом 2 мл. Планшеты для очистки получали путем внесения пипеткой 800 мкл смеси 1: 4 MabSelect SuRe (GE Healthcare) и DPBS/-суспензии в каждую лунку 96-луночного стеклянного фильтровального планшета с 1 мкМ порами Acroprep Advance (Pall). К планшету прикладывали вакуумное давление 200 мбар для удаления избытка PBS и затем промывали 800 мкл свежего PBS. Для удаления промывочного буфера применяли давление вакуума 200 мбар. Затем осветленные супернатанты переносили на смолу, промытую PBS, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин. После инкубации применяли вакуумное давление 200 мбар для удаления супернатанта. MabSelect Sure трижды промывали PBS и один раз 25 mM натрий ацетата, pH 5 (TEKNOVA; г. Холлистер, штат Калифорния) при давлении вакуума 200 мбар между промывками для удаления избыточного буфера. Связанные со смолой мкАт элюировали 0,1 M натрий ацетатом, pH 3,5, и инкубировали в течение 10 мин для эффективной диссоциации. Планшет с фильтром помещали на 96-луночный планшет и элюированные мкАт собирали в нижнем планшете путем центрифугирования при 1000 g в течение 2 мин, для нейтрализации мкАт добавляли 80 мкл 2,5 M трис-

ацетата, рН 7,2. мкАт диализовали в PBS в течение ночи в 96-луночном планшете DispoDIALYZER (Harvard Apparatus; г. Холлистон, штат Массачусетс), переносили в 96-луночный фильтровальный планшет с 0,2 мкМ порами Supor AcroPrep Advance (Pall; г. Порт Вашингтон, штат Нью-Йорк), помещали на 96-луночный планшет с глубокими лунками, и растворы белков фильтровали путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 мин в настольной центрифуге. Концентрации белка определяли путем измерения при длине волны A280 на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

Таблица 38

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей мкАт к CD33

ID HC	SEQ ID NO	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
B23H1	246	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGK ALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNM DPVDTATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLTVTVSS
CD3H141	247	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGGQGLTVTVSS
CD3H219	20	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPS RGGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQL NSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGLTVTVSS
C33H42	248	QLQLQESGPGLVNPSETLSHTCTVSGGSISSSSHYWGWRQPPG KGLEWIGKIYYSGNTYYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKMSSVT AADTAVYYCARLADVVPVPAARYFDSWGQGLTVTVSS
C33H44	249	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVRSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYHCARETMFRGLMDYWGQGLTVTVSS
C33H45	250	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPG KGLEWVAVISYDGSNKYCADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN LRAEDTAVYYCAKDFRSLDWLPPDSTSYDGMVWGQGTTVT VSS
C33H46	251	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTNYAMNWVRQAP GGGLEWMGWINTNTGNPTYAQAFTGRFVFLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARDREVRDYWGQGLTVTVSS
C33H48	252	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSTNYWGWRQPPG KGLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARLADVVPVPAARYFDYWGQGLTVTVSS
C33H49	253	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSGFYWGWRQPPR KGLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYFCARLADVVPVPAARYFDNWWGQGLTVTVSS
C33H51	254	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTGRYYWGWRQPPG KGVWIGNIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARLGSVVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H52	255	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWRQPP GKGLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST AADTALYYCARLGSVVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H55	256	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSNWSWVRQPPG RGGLEWIGEIYHSGNTNNSPSLKSRTISADKSKNQFSLKLSST ADTAVYFCARIIAVARYFDSWGQGLTVTVSS
C33H65	257	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVVVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRDFDWLPPDSTSYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H66	258	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVAVSGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEGTAVYYCAKDFRFDWLPDASVYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H68	259	EVQLLESGGGLVQPGGSLGLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPG KGLNWVSAIDYSGNDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKESQLLHGLFEHWGQGLTVTVSS
C33H69	26	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWRQPPG KGLDWIGSINYSYSTYYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSVTA ADTAVYYCARLDGYESPFYWGQGLTVTVSS

C33H70	261	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWRQPPG KGLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARLGSLVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H72	262	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KLEWVANIKQHGESEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLTVTVSS
C33H73	263	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSSYAMTWVRQAPGK GLEWVSTINISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCTKGGYSSGPFYWGQGLTVSVSS
C33H74	264	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASRFTFSSYGMHWVRQAPG KLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVHYCAKDFRSFDWLPDSSASYHGMDVWGQGT TVSS
C33H76	265	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARTYNSGYDGFYWGQGLTVTVSS
C33H78	266	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCAKDFRYFDWLPDSSSYGMDVWGQGT TVSS
C33H80	267	QVQLVQSGSELKPGASVKVCKASGYTFTNYAMNWVRQAP GQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSSAYLQIS SLKAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGLTVTVSS
C33H81	268	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPDSSASYHGMDVWGQGT TVSS
C33H84	269	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPDSTSYGMDVWGQGT TVSS
C33H87	270	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KLEWVANIKQHGESEKYYVDSVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMN SLRTEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLTVTVSS
C33H88	271	QVQLVQSGSELKPGASVKVCKASGYTLTRSAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLLISS LKTEDTAVYYCASDILPGYHEDYWGQGLTVTVSS
C33H90	272	QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWRQSPS RLEWLGRTYYRSKWyNDYALSQSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCAREVAVAASFYWGQGLTVTVSS
C33H91	273	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSHYWGWIRQPPG VGLEWIGSIYTGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARLADIVVPAARYFDYWGQGLTVTVSS
C33H92	274	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSSSYWGWRQPPG KGPEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLISMTA ADTAVFYCARLAATIVVPAARYFDCWGQGLTVTVSS

C33H98	275	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQHGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLTVTVSS
C33H99	276	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRPAPG KGLEWVANIKRDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAAANSLYLQMN SLRVEDTAVYYCARPFYDHFYDWGQGLTVTVSS
C33H108	277	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFSTYAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISS LKAEDTAVYYCARDRDRGTDYWGQGLTVTVSS
C33H249	278	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCV ASGFTFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LKTEDTAFYYCTKDTPTYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H250	279	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAGSGFTFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQNL KTEDTAFYYCAKDSPTYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H251	280	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFKISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSPTYGDFDYWGQGLTVTVSS
C33H252	281	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSPTYGDFDYWGQGLTVTVSS
C33H253	282	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFRSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAINGYDGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYSCAKDQGFELFFDYWGQGLTVTVSS
C33H254	283	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPD KGLEWVAVIWFDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRELLFDYWGQGLTVTVSS
C33H255	284	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPG EGLEWVSGISWNGGDMVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRPEDTALYYCVKDMPIYDFDLTGSDYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
C33H256	285	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYVGSHKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGSLCFDYWGQGLTVTVSS
<b>ID LC</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</b>
B23L3	286	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSV DYNIGISYMHWYQK PGQPPKLLIYAASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQIEDPWFQGTQKVEIK
CD3L66	287	QTVVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
CD3L150	52	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDK APKVLLYEVS KRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

C33L8	288	SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDKLGNKYACWYQQKPGQSPV LVIIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQ AWDSSTYVFGTGKTVL
C33L10	289	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGSNIGSKSVHWYQQKPGQAP VMVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSTDVVFVGGGKLTVL
C33L11	290	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYACWYQQKPGQSP VVVIYKDSKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFVGGGKLTVL
IAPL24	291	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFVGGGKLTVL
C33L58	292	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VLVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTYVFGTGKTVL
C33L59	293	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VLVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYYC QAWDISTYVFGTGKTVL
C33L34	294	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQLRPGQSPI LVIIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ AWDSSTWVFVGGGKLTVL
N46L109	295	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTWVFVGGGKLTVL
C33L42	296	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGIKSVHWYQQKPGQAP VLVVYDDSDRPPGIPERFSGSNSGNTATLTITRVEAGDEADYYC QVWDSSTDHVVFVGGGKLTVL
C33L47	297	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VVVIYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFVGGGKLTVL
C33L60	298	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSP VLVIYQDGKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYC QAWDRNTVVFVGGGKLTVL
C33L17	299	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKAGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFILIISLQAED VAVYYCQYYGTPWTFGQGTKEIK
C4LL152	300	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANSFPFTFGPGTKVDIK
C33L40	301	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPV LVIIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQ AWDSSTVVFVGGGKLTVL
C33L32	302	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYVVRWYQQKTGQSP VLVMIYQDSKRPSGIRERFYGSNSGNTATPTISGTQAVDEAEYY CQAWDSSTGVVFVGGGKLTVL

C33L38	303	SYELTQPPSVSVPPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWGRNTVVFGGGTKLTVL
C33L39	304	QSALTQPASVSGSPGQSIPISSTGTSSDDGKNNIVSWYQQHPGK APKLMYKDSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQADDEADY HCCSYAGASNHVVFVFGGGTKLTVL
C33L57	305	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGNKYACWYQQKPGQSP VVVVYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYY CQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L73	306	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDNVYVSWYQQHPGK VPKLMYDVSNRPSGVSNRFGSMSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVL
C33L53	307	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSNTVVFGGGTKLTVL
C33L66	308	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSP VVVIHQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L35	309	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDTRKRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L61	310	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGINSVDVGSYDLVSWYQQHPGK APKLLIYDGSERPSGVFGRFSGSKSDNTTSLTISGLQAEDEAA YCCSYEVTTTTYVVFVFGGGTKLTVL
C33L51	311	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWSQQKPGQAP VLVVYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSNSDHVVFVFGGGTKLTVL
C33L44	312	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISETQAMDEADYYC QAWDSSTYVFGTGTKVTVL
C33L30	313	SYELTQPPSVSVSPGQTVSISCSGDRLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSSYVFGTGTKVTVL
C33L69	314	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFACWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L37	315	SYVLTQPPSVAVAPGQTARITCGGSNIGKISVHWYQQKAGQAP VLVHDDRARPSGIPERLSGNSGTTATLTISRVEVGDEADYYC QVWNSSSVHPVVFVFGGGTKLTVL
C33L74	316	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDDNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQSEDEADY YCSSYSSSTTLEVFGGGTKLTVL
C33L115	317	DIQMTQSPSSVWASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQQPGKA PNLLIYRSSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QDNSFPYTFGQGKLEIK

C33L116	318	DIQMTQSPSEWASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYGASSWQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC QQDNSFPYTFGQGTKLEIK
C33L117	319	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGTDFTLTVSSLQAE DVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK
C33L118	320	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGTDFTLTVSSLQAE DVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK
C33L119	321	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFRSGSGTEFTLTISSLPDDFATYCCQ QYNSYPWTFGQGTKVEIK
C33L120	322	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDYACWYQQKPGQSP LVVIYQDSKRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYC QTWDTRIAVFGGGTNTLTVL
C33L121	323	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGNEHVCWYHQKPGQSP VLVIYQNNKRPSGIPERFSGNSGNTATLSISGTQATDEADYYC QAWDSTTAVFGGGTKLTVL
C33L122	324	SYELTQPPSVSVSPGQTANISCSGVTLGYNAYWYQQKPGQSPI LVISQDTQRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQ AWDITTVLFGGGTKLTVL
C33L132	325	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDGKRPSGIPERFSGNFGNKATLTISGTQAMDEADYYC QAWDRNTVVFVGGTKLTVL
C33L41	326	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSTTVVFVGGTKLTVL

Таблица 39

## Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи мкАт к CD33

ID HC	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23H1	GFSLSTSG MG	327	IYWDDDK	368	ARLYGFTYGFAY	409
CD3H1 41	GFTFNTYA	328	IRSKYNNY AT	369	ARHGNFGNSYVSWFAY	410
CD3H2 19	GDSVFNNN AA	329	TYRYSKW LY	370	ARGYSSFDY	411
C33H42	GGSISSSH Y	330	IYYSGNT	371	ARLADVVPVPAARYFDS	412
C33H44	GDSVSSNS AA	331	TYRYSKW YN	372	ARETMFRGLMDY	413
C33H45	GFTFSSYG	332	ISYDGSNK	373	AKDFRSLDWLPPDSTSYDG MDV	414
C33H46	GYTFTNYA	333	INTNTGNP	374	ARDREVRDY	415
C33H48	GGSIIRSTNY	334	IYYSGNT	375	ARLADVVPVPAARYFDY	416



	Y					
C33H49	GG SIRSSGF Y	335	IY YSGNT	376	ARLADV VVVPAARYFDN	417
C33H51	GG SISTGRY Y	336	IY YSGNT	377	ARLGLV VVVPAAMSFYD	418
C33H52	GG SIRGSSY Y	337	IY SSGNT	378	ARLGLV VVVPAAMSFYD	419
C33H55	GG SISSSNW	338	IY HSGNT	379	ARI IAVARYFDS	420
C33H65	GFT FSSYG	339	IS YDGSNK	380	AKDFRDFDWLPPDSTS YHG MDV	421
C33H66	GFT FSSYG	340	IS YDGSNK	381	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	422
C33H68	GFT FSGYA	341	ID YSGNDT	382	AKESQLLHGLFEH	423
C33H69	GG SISSSSY Y	342	IN YSGST	383	ARLDGYESPFYD	424
C33H70	GG SIRGSSY Y	343	IY SSGNT	384	ARLGLV VVVPAAMSFYD	425
C33H72	GFT FSSYW	344	IKQH GSEK	385	ARDRDLGYFDY	426
C33H73	RFT FSSYA	345	IN ISGGST	386	TKGGYSSGPFYD	427
C33H74	RFT FSSYG	346	IS YDGSNK	387	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	428
C33H76	GFT FNAYA	347	IS GSGGST	388	ARTYNSGYDGDYFDY	429
C33H78	GFT FSSYG	348	IS YDGSNK	389	AKDFRYFDWLPPDSSSYG MDV	430
C33H80	GYTFTNYA	349	INTNTGNP	390	ATDRDRGTDY	431
C33H81	GFT FSAYG	350	IS YDGSNK	391	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	432
C33H84	GFT FSSYG	351	IS YDGSNK	392	AKDFRSFDWLPPDSTS YG MDV	433
C33H87	GFT FSSYW	352	IKQH GSEK	393	ARDRDLGYFDY	434
C33H88	GYTLTRSA	353	INTNTGNP	394	ASDILPGYHEDY	435
C33H90	GDSVSSNS AA	354	TY YRSKW YN	395	AREVAVAASFYD	436
C33H91	GG SISRSRSH Y	355	IY YTGST	396	ARLADIVVVPAARYFDY	437
C33H92	GG SIRSSSY Y	356	IY SSGNT	397	ARLAATIVVPAARYFDC	438
C33H98	GFT FSSYW	357	IKQH GSEK	398	ARDRDLGYFDY	439
C33H99	GFT FSSYW	358	IKRDGGEK	399	ARPFYDHFYD	440
C33H10	GYTFSTYA	359	INTNTGNP	400	ARDRDRGTDY	441
8						
C33H24 9	GFT FDDYA	360	LSWNGGNI	401	TKDTPYGDYFDY	442
C33H25 0	GFT FDDYA	361	LSWNGGNI	402	AKDSPYGDYFDY	443
C33H25 1	GFT FDDYA	362	IGWSGCSI	403	AKDSPYGDFFDY	444
C33H25 2	GFT FDDYA	363	IGWSGCSI	404	AKDSPYGDFFDY	445
C33H25 3	GFTFRSYA	364	INGYGDGR	405	AKDQGFGELEFFDY	446
C33H25 4	GFTFSYYG	365	IWFDGNNK	406	ARDRELLFDY	447
C33H25 5	GFT FDDYA	366	ISWNGGD M	407	VKDMPYFDFLTGS DYYYYG MDV	448
C33H25 6	GFTFSNYG	367	IWYVGS HK	408	ARDGSLCFDY	449

Последовательности CDR1-3 легкой цепи мкАт к CD3

ID LC	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23L3	QSVDYNGISY	450	AAS	492	QQIIEDPWT	534
CD3L66	TGAVTTSNY	451	GTN	493	ALWYSNLWV	535
CD3L150	SSNIGTYKF	452	EVS	494	VSYAGSGTLL	536
C33L8	KLGNKY	453	QDS	495	QAWDSSTYV	537
C33L10	NIGSKS	454	DDS	496	QVWDSSSDVV	538
C33L11	KLGDKY	455	KDS	497	QAWDSSTVV	539
IAPL24	KLGDKY	456	QDS	498	QAWDSSTVV	540
C33L58	KLGDKY	457	QDY	499	QAWDSSTYV	541
C33L59	KLGDKY	458	QDY	500	QAWDISTYV	542
C33L34	KLGDKY	459	QDS	501	QAWDSSTWV	543
N46L109	KLGDKY	460	QDS	502	QAWDSSTWV	544
C33L42	NIGIKS	461	DDS	503	QVWDSSSDHVV	545
C33L47	KLGDKY	462	QDR	504	QAWDSSTVV	546
C33L60	KLGDKY	463	QDG	505	QAWDRNTVV	547
C33L17	QSVLYSSNNK NY	464	WAS	506	QQYYGTPWT	548
C4LL152	QGISSW	465	AAS	507	QQANSFPFT	549

C33L40	KLGAKF	466	QDN	508	QAWDSSTVV	550
C33L32	KLGDKY	467	QDS	509	QAWDSSTGVV	551
C33L38	KLGDKY	468	QDN	510	QAWGRNTVV	552
C33L39	SSDDGKNNI	469	KDS	511	CSYAGASNHVV	553
C33L57	ELGNKY	470	QDR	512	QAWDSSTVV	554
C33L73	SSDVG DYNY	471	DVS	513	SSYSSSSALEV	555
C33L53	KLGDKY	472	QDN	514	QAWDSNTVV	556
C33L66	KLGDKY	473	QDR	515	QAWDSSTVV	557
C33L35	KLGNKY	474	QDT	516	QAWDSSTVV	558
C33L61	NSDVGSYDL	475	DGS	517	CSYEVTTTYVV	559
C33L51	NIGSKS	476	DDS	518	QVWDSNSDHVV	560
C33L44	KLGDKY	477	QDS	519	QAWDSSTYV	561
C33L30	RLGDKY	478	QDS	520	QAWDSSSYV	562
C33L69	KLGSKF	479	QDS	521	QAWDSSTVV	563
C33L37	NIGKIS	480	DDR	522	QVWNSSSVHPV	564
C33L74	SSDVGDDNY	481	DVS	523	SSYSSSTTLEV	565
C33L11 5	QGISSW	482	RSS	524	QQDNSFPYT	566
C33L11 6	QGISSW	483	GAS	525	QQDNSFPYT	567
C33L11 7	QTVLYSSNNK NY	484	WAS	526	QHYYSTPYT	568
C33L11 8	QTVFYSSNNK NY	485	WAS	527	QHYYSTPYT	569
C33L11 9	QSISW	486	KAS	528	QQYNSYPWT	570
C33L12 0	ELGDMY	487	QDS	529	QTDWTRIAV	571
C33L12 1	NLGNEH	488	QNN	530	QAWDSTTAV	572
C33L12 2	TLGYNY	489	QDT	531	QAWDITTVL	573
C33L13 2	KLGDKY	490	QDG	532	QAWDRNTVV	574
C33L41	KLGNKY	491	QDS	533	QAWDSSTVV	634

#### 5.5. Определение характеристик мкАт к CD33.

Антитела OMNIRat, идентифицированные посредством иммунизации, клонированные в v-области, а затем экспрессированные и очищенные, были дополнительно охарактеризованы на связывание с экспрессирующими CD33 клетками и на связывание с рекомбинантными антигенами. Очищенные антитела оценивали на связывание со стабильно трансфицированными клетками HEK293F, экспрессирующими CD33 человека или CD33 яванского макака (получение описано выше), вместе с исходным HEK293F в качестве отрицательного контроля. Клетки собирали из колб для тканевых культур с использованием неферментативного буфера для диссоциации (Thermo Scientific). Колбы дважды промывали PBS и в колбу добавляли буфер для диссоциации и инкубировали колбу в течение 10 мин при 37°C до тех пор, пока клетки не становились неприлипающими. Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и ресуспендировали при  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в буфере для окрашивания (Becton Dickinson; г. Франклин-Лейкс, штат Нью-Джерси, США). Клетки каждого типа высевали в количестве 50000 клеток на лунку в 50 мкл окрашивающего буфера на круглодонные планшеты (Becton Dickinson). Добавляли 50 мкл исследуемого мкАт или изотипического контроля в 2x концентрации в 3 разведениях и ноль (120, 12, 1,2 и 0 нМ), и полученный раствор инкубировали в течение 30 мин при 4°C. 100 мкл окрашивающего буфера добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, буфер удаляли, 200 мкл буфера для окрашивания добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и удаляли буфер. 50 мкл 2 мкг/мл конъюгированного с AF647 вторичного козьего антитела к человеческому Fc (Jackson ImmunoResearch; г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Во все лунки планшетов добавляли 100 мкл окрашивающего буфера, планшеты центрифугировали при 300 g в

течение 5 мин и буфер удаляли. 200 мкл рабочего буфера (рабочий буфер представляет собой буфер для окрашивания, 1 мМ ЭДТК, 0,1% плурониловой кислоты) добавляли во все лунки планшетов, планшеты вращали при 300 g в течение 5 мин и буфер удаляли. Во все лунки с клетками добавляли 30 мкл рабочего буфера, содержащего краситель Sytox Green Live/Dead (ThermoFisher), и планшеты считывали на проточном цитометре iQue IntelliCyt. Клетки гейтировали по прямому и боковому рассеянию для удаления остатков клеток, затем по синглетам, а затем по живым клеткам, в которых было исключено окрашивание Sytox. Связывание антитела оценивали по средней интенсивности флуоресценции в канале AF647.

Для начала оценки биофизических свойств связывания очищенных мкАт проводили скрининг на скорость диссоциации. 76 мкАт OMNTRat к CD33 тестировали на связывание с рекомбинантными белками ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) и ВКД CD33 яванского макака с HSA (C33W1) (продукция Janssen) человека, и скорость диссоциации измеряли с помощью платформы IBIS MX96 SPRi (Carterra; г. Ньютон, штат Пенсильвания). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson Immunoresearch, кат. № 109-005-098) были непосредственно иммобилизованы по amino-группе в концентрации 100 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 4,5, с использованием сенсорного чипа CMD50m (Xantec, партия CMD50m0415.a) со временем ассоциации 10 мин в приборе IBIS. Был достигнут средний уровень иммобилизации GAN-Fc~ 9000 Ru. Сенсорный чип переносили в устройство Continuous Flow Microspotter (CFM) для захвата каждого мкАт к CD33 в концентрации 10 мкг/мл в течение 10 мин. Связывание измеряли на IBIS SPRi по кинетике одного цикла без регенерации. Каждую серию концентраций антигена (3 мкМ в серии 3-кратных разведений) последовательно вводили от низких (0,46 нМ) до высоких концентраций (3 мкМ) для связывания с захваченными мкАт со временем ассоциации 5 мин и временем диссоциации 15 мин с использованием PBST (PBS с 0,005% Tween) в качестве рабочего буфера. Необработанные данные о связывании (формат файла.trix) были привязаны и выровнены с помощью программного обеспечения SprintX (Wasatch, версия 1.9.3.2), а затем экспортированы (формат файла.ibmх) в программу Scrubber (вер. 2.0) для кинетического анализа связывания 1:1 (Wasatch, версия 2.0.0.33) с получением  $k_{off}$ .

В табл. 41 ниже приведены 32 лучших клон, оцененных по связыванию с линиями клеток, экспрессирующими CD33 человека и яванского макака, а также с рекомбинантным антигеном (скорость диссоциации по меньшей мере  $>10e-3$  для одного из антигенов). Из этих 32 все, кроме 4, продемонстрировали заметное связывание с экспрессирующими клетками или человека, или яванского макака. Для всех 32 определяли дополнительные характеристики с помощью эпителио-специфической сортировки и полного кинетического анализа.

Таблица 41

Анализ связывания клеток и скорости диссоциации антител к CD33, полученных из OMNIRat

ID белка по а.к.	% Мо п	60 нМ CD33	6 нМ CD33	0,6 нМ CD33	0 нМ CD33	$K_D$
C33B48	91,96	400995,84	428948,75	391157,69	91,12	5.47E-05
C33B73	100,00	201493,02	33443,28	4034,64	93,98	9.12E-05
C33B125	98,48	258779,13	79728,78	9203,75	78,26	1.54E-04
C33B55	96,39	188278,42	59155,10	7625,56	105,39	2.15E-04
C33B96	98,75	476040,28	475653,41	187925,80	55,23	2.28E-04
C33B124	100,00	798,33	126,37	90,26	172,03	2.38E-04
C33B72	96,94	328194,72	105474,59	12506,85	93,32	2.84E-04
C33B79	100,00	236644,03	41925,89	4988,81	77,78	3.28E-04
C33B77	92,11	241787,16	88691,05	11484,97	69,46	3.37E-04
C33B82	96,21	188508,56	41264,92	5033,60	73,44	3.41E-04
C33B87	100,00	242185,48	79532,87	12547,05	73,65	3.52E-04
C33B80	98,33	5799,64	409,97	114,93	88,88	3.84E-04
C33B101	96,91	268805,28	204984,16	35513,63	70,07	3.98E-04
C33B83	98,07	92956,55	7856,70	1020,48	87,37	4.61E-04
C33B46	95,81	509865,97	447627,97	418017,22	134,53	4.67E-04
C33B94	98,31	200142,00	93852,22	13274,87	89,59	5.38E-04

## 045935

C33B88	98,36	393148,13	481100,91	274293,53	94,81	8.25E-04
C33B66	98,71	444680,31	313288,41	56628,04	129,73	8.59E-04
C33B120	97,63	190036,14	60357,11	7054,28	92,94	1.40E-03
C33B64	98,13	200158,36	54138,77	7556,04	114,85	1.71E-03
C33B52	96,76	196557,09	46286,13	6751,01	82,46	3.13E-03
C33B56	95,59	143,73	79,73	111,95	138,04	4.02E-03
C33B75	98,68	163795,25	29603,57	4517,81	95,94	4.16E-03
C33B107	96,90	375388,25	339798,53	161369,64	86,54	4.44E-03
C33B63	98,79	247758,77	62221,71	9671,48	86,34	4.57E-03
C33B95	97,77	154556,58	44354,07	6402,00	87,38	5.99E-03
C33B61	98,87	198777,34	38699,10	5308,45	79,84	6.71E-03
C33B89	100,00	315,38	119,12	65,61	70,94	8.11E-03
C33B122	98,49	259183,69	84281,03	14291,17	65,01	8.74E-03
C33B62	99,05	157786,36	37359,44	6092,03	75,00	1.00E-02
C33B123	95,08	224078,95	88155,99	8864,39	71,05	1.03E-02
C33B54	100,00	147753,30	27461,06	3766,69	61,26	2.48E-02
<b>ID белка по а.к.</b>	<b>60 нМ CD33 яванского макака</b>	<b>6 нМ CD33 яванского макака</b>	<b>0,6 нМ CD33 яванского макака</b>	<b>0 нМ CD33 яванского макака</b>	<b>K<sub>D</sub> связывания CD33 яванского макака</b>	
C33B48	56491,32	47326,85	43351,12	94,01	1.20E-04	
C33B73	14799,14	6987,92	795,57	72,51	4.08E-04	
C33B125	15603,45	11526,47	3458,27	70,22	3.51E-04	
C33B55	16020,78	9994,42	2433,94	69,38	1.16E-04	
C33B96	37273,19	20087,29	11574,59	86,31	8.19E-04	
C33B124	593,00	132,19	77,26	98,41	4.77E-04	
C33B72	19422,07	13975,14	3894,84	90,81	7.63E-04	
C33B79	15538,97	6427,73	1082,85	63,59	6.82E-03	
C33B77	17516,20	11665,49	3601,76	85,23	4.18E-04	
C33B82	14269,38	6622,07	1540,09	84,24	6.70E-04	
C33B87	19597,18	12652,44	3266,36	103,07	2.28E-04	
C33B80	4612,58	248,60	108,93	82,38	2.66E-04	
C33B101	48016,75	46115,96	17989,37	79,69	1.06E-04	
C33B83	5304,40	687,44	159,37	87,35	2.17E-03	
C33B46	49840,14	49816,36	49729,78	92,05	1.48E-04	

<b>C33B94</b>	16126,84	10782,54	3183,70	87,82	5.37E-04
<b>C33B88</b>	50388,18	43928,95	43940,23	90,13	3.89E-04
<b>C33B66</b>	48905,04	49076,39	42160,22	77,96	9.33E-05
<b>C33B120</b>	13211,32	7865,37	2726,18	75,77	8.54E-04
<b>C33B64</b>	21109,59	9685,04	3102,56	99,82	1.21E-03
<b>C33B52</b>	12582,90	8444,39	2063,44	75,24	1.20E-03
<b>C33B56</b>	104,27	85,94	78,56	83,31	8.46E-04
<b>C33B75</b>	12194,41	5577,80	1709,40	124,32	1.20E-03
<b>C33B107</b>	50325,07	47810,05	36786,69	55,11	1.35E-04
<b>C33B63</b>	18322,71	11642,38	2879,89	87,94	9.47E-04
<b>C33B95</b>	14774,34	9594,12	1637,99	80,81	6.98E-03
<b>C33B61</b>	13552,71	8211,09	1595,90	106,84	1.83E-03
<b>C33B89</b>	47301,14	34193,78	23334,20	112,80	4.65E-05
<b>C33B122</b>	19740,29	13907,32	5838,25	82,53	1.45E-03
<b>C33B62</b>	12737,71	5620,17	1922,97	934,44	1.32E-03
<b>C33B123</b>	10665,93	10404,03	3232,18	61,08	2.74E-03
<b>C33B54</b>	50466,68	43011,75	38091,89	28785,80	1.35E-04

Затем панель мкАт была дополнительно охарактеризована в полном анализе аффинности, а также в эпитоп-специфической сортировке. Связывание мкАт к CD33 с рекомбинантным ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) и ВКД CD33 яванского макака с HSA (C33W1) измеряли при помощи ППР ProteOn (Bio-Rad). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-098) напрямую иммобилизованы по аминокислотной группе в концентрации 30 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 5,0, во всех 6 вертикально ориентированных лигандных каналах на чипе GLC Sensor (Bio-Rad, кат. № 176-5011) при скорости потока 30 мкл/мин в PBS, содержащем 0,005% Tween-20. Значения плотности иммобилизации в среднем составляли около 5000 единиц ответа (RU) с менее чем 5% разбросом между разными каналами. Различные мкАт захватывали на поверхности антитела к человеческому Fc IgG в концентрации 0,25 или 0,5 мкг/мл (160~300 RU) в вертикальной ориентации лиганда, с отсутствием 6-го лигандного канала в качестве контроля поверхности лиганда. Белки CD33 человека и яванского макака с HSA при концентрации 0,3 мкМ в серии 3-кратных разведений из 5 концентраций применяли в качестве аналита для связывания с захваченными мкАт в горизонтальной ориентации. Образец буфера также вводили в 6-й канал для контроля диссоциации захваченного мкАт и стабильности базовой линии. Фазу диссоциации для всех концентраций CD33-HSA человека и яванского макака контролировали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 15 мин на связывание с C33B782, 60 мин на связывание с C33B912 (идентично C33B904 с hIgG4) с последующей регенерацией с использованием 18-секундного импульса 0,85% фосфорной кислоты для удаления антигена и связанного мкАт.

Необработанные данные о связывании сравнивали с двойным контролем после вычитания данных ответа из 1) сигналов между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) канала буфера для коррекции смещения базовой линии из-за диссоциации со временем захваченного мкАт с поверхности. Обработанные данные для всех концентраций антигена для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения кинетических констант ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и константы аффинности ( $K_d$ ).

Чтобы определить, связывает ли все мкАт панели с 1 отдельным эпитопом или имеется широкий охват эпитопов, был проведен эксперимент по эпитоп-специфической сортировке. Конкурентную эпитоп-специфическую сортировку мкАт к CD33 выполняли на приборе IBIS SPRi (Carterra) с использованием сенсорного чипа с призмным возбуждением CMD-200 M. Каждое антитело к CD33 напрямую иммобилизовали по аминокислотной группе на чипе в концентрации 10 мкг/мл в ацетатном буфере (pH 4,5) с использованием отдельной Continuous Flow Microspotter (CFM). Затем напечатанный сенсорный чип переносили в инструмент IBIS для анализов сортировки с использованием классического формата или "сэндвич" формата. Сортировку выполняли последовательной инъекцией ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) в концентрации 50 нМ с последующей однократной инъекцией мкАт к CD33 в качестве конкурирующего аналита в растворе при 133 нМ для связывания иммобилизованных мкАт к CD33 с поверхностной регенерацией после каждого последовательного цикла введения антигена и антитела.

Для отслеживания активности иммобилизованных мкАт перед регенерацией и после нее в начале и в конце эксперимента выполняли инъекцию буфера без какого-либо конкурирующего мкАт с целью измерения активности связывания только с антигеном. Реакция связывания конкурирующего мкАт относительно связывания буфера (только антиген) является показателем того, блокирует ли антитело в

растворе связывание антигена с иммобилизованными мкАт или ограничивает его. Необработанные данные о сортировке (формат файла.trix) были привязаны и установлены на нуль с помощью программного обеспечения SprintX (Wasatch, версия 1.9.3.2), а затем экспортированы (формат файла.ibmx) в программу для сортировки HtTools.exe (Wasatch, версия 2.0.0.33) для анализов. Данные обрабатывали путем удаления антител с ответами на антигены ниже 20 RU и антител, которые не блокировали себя. Ответы конкурирующих мкАт нормализовали относительно связывания только с антигеном. Антитела с нормализованными ответами <0,25 обозначали как блокаторы, антитела с нормализованными ответами >0,25 обозначали как неблокаторы/ "сэндвичи". Различные группы были спрогнозированы с использованием отсечения по высоте 2,5 на графике комбинированных дендрограмм.

В приведенной ниже таблице обобщены полный кинетический анализ и эпитоп-специфическая сортировка для 32 выбранных мкАт. Всего имеется 8 мкАт к CD33, которые обладают субнанолярной аффинностью к CD33 как человека, так и к яванского макака, и эти мкАт соответствуют 3 отдельным группам эпитопов, в то время как большая панель имеет диапазон аффинностей и 7 отдельных групп эпитопов.

Таблица 42

Полный кинетический анализ и эпитоп-специфическая сортировка мкАт, полученных из OMNIRat

ВКД CD33 человека с HSA					
ID белка по а.к.	ID V-области	$K_d$ (1/M*с)	$K_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	Эпитопная группа
C33B48	C33F53	1.62E+06	1.82E-05	1.12E-11	1
C33B46	C33F51	1.45E+06	1.99E-03	1.38E-09	1
C33B66	C33F71	3.85E+04	2.03E-03	5.29E-08	1
C33B107	C33F112	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	1
C33B88	C33F93	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	1
C33B96	C33F101	2.26E+05	4.36E-04	1.92E-09	3
C33B101	C33F106	1.62E+05	1.08E-03	6.64E-09	3
C33B73	C33F78	5.59E+05	5.59E-05	1.00E-10	4
C33B125	C33F130	9.92E+05	1.34E-04	1,40E + -10	4
C33B55	C33F60	9.85E+05	2.53E-04	2.60E-10	4
C33B82	C33F87	4.45E+05	2.70E-04	6.10E-10	4
C33B83	C33F88	2.70E+05	5.21E-04	1.93E-09	4
C33B75	C33F80	3.85E+05	4.41E-03	1.14E-08	4
C33B123	C33F128	1.02E+06	1.52E-02	1.48E-08	4
C33B52	C33F57	2.06E+05	3.96E-03	1.92E-08	4
C33B61	C33F66	4.89E+05	1.05E-02	2.14E-08	4
C33B62	C33F67	5.07E+05	1.26E-02	2.49E-08	4
C33B64	C33F69	4.33E+05	2.21E-03	5.10E-09	4
C33B63	C33F68	5.33E+05	3.74E-03	7.01E-09	4
C33B122	C33F127	7.47E+05	7.12E-03	9.53E-09	4
C33B72	C33F77	8.71E+05	2.00E-04	2.30E-10	5
C33B79	C33F84	5.15E+05	3.90E-04	7.60E-10	5
C33B77	C33F82	8.28E+05	2.62E-04	3.20E-10	6
C33B87	C33F92	7.20E+05	4.32E-04	6.00E-10	6
C33B94	C33F99	9.22E+05	5.85E-04	6.30E-10	6
C33B95	C33F100	4.82E+05	7.40E-03	1.54E-08	6
C33B120	C33F125	5.75E+05	1.68E-03	2.93E-09	6
C33B89	C33F94	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	8

C33B54	C33F59	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	9
C33B124	C33F129	3.57E+05	1.24E-04	3.50E-10	НС
C33B80	C33F85	3.23E+05	4.25E-04	1.32E-09	НС
C33B56	C33F61	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	НС
<b>ВКД CD33 яванского макака с HSA</b>					
ID белка по а.к.	ID V-области	$k_a$ (1/М*с)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	Эпитопная группа
C33B48	C33F53	4.31E+06	1.58E-04	3.66E-11	1
C33B46	C33F51	2.97E+06	3.75E-04	1.26E-10	1
C33B66	C33F71	1.22E+06	2.66E-04	2.17E-10	1
C33B107	C33F112	3.31E+05	7.01E-05	2.12E-10	1
C33B88	C33F93	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	1
C33B96	C33F101	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	3
C33B101	C33F106	2.25E+05	2.69E-04	1.20E-09	3
C33B73	C33F78	6.00E+05	5.08E-04	8.46E-10	4
C33B125	C33F130	1.12E+06	3.39E-04	3.04E-10	4
C33B55	C33F60	1.16E+06	8.37E-05	7.23E-11	4
C33B82	C33F87	5.45E+05	7.51E-04	1.38E-09	4
C33B83	C33F88	2.47E+05	2.88E-03	1.17E-08	4
C33B75	C33F80	6.16E+05	1.32E-03	2.15E-09	4
C33B123	C33F128	1.26E+06	3.39E-03	2.69E-09	4
C33B52	C33F57	3.13E+05	1.48E-03	4.74E-09	4
C33B61	C33F66	7.34E+05	1,62E - 03	2.21E-09	4
C33B62	C33F67	8.05E+05	1.49E-03	1.85E-09	4
C33B64	C33F69	5.90E+05	1.01E-03	1.71E-09	4
C33B63	C33F68	7.23E+05	8.80E-04	1.22E-09	4
C33B122	C33F127	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	связывание/отсутствие соответствия	4
C33B72	C33F77	9.19E+05	5.40E-04	5.87E-10	5
C33B79	C33F84	5.48E+05	2.20E-03	4.01E-09	5
C33B77	C33F82	1.08E+06	2.66E-04	2.47E-10	6
C33B87	C33F92	1.12E+06	2.64E-04	2.36E-10	6
C33B94	C33F99	1.10E+06	5.20E-04	4.73E-10	6
C33B95	C33F100	8.44E+05	8.06E-03	9.56E-09	6
C33B120	C33F125	8.76E+05	9.02E-04	1.03E-09	6
C33B89	C33F94	2.65E+05	2.01E-04	7.60E-10	8
C33B54	C33F59	1.32E+06	6.37E-04	4.84E-10	9
C33B124	C33F129	4.67E+05	4.72E-04	1.01E-09	НС
C33B80	C33F85	4.92E+05	2.59E-04	5.27E-10	НС
C33B56	C33F61	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	НС

Панель OmniMouse (всего 8 мкАт) создавали отдельно и дополнительно характеризовали на связывание с клетками. Связывание с клетками проводили, как описано выше, и оно обобщено в таблице ниже. Из 8 протестированных мкАт 6 напрямую связывались с CD33-экспрессирующими клетками, тогда как 2 мкАт не связывались.



Таблица 43

Клеточное связывание полученных из OMNIMouse мкАт с линиями экспрессирующих клеток человека и яванского макака

мкАт	Исходное				CD33 человека			
	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ
<b>C33B909</b>	253,50	206,04	169,77	119,51	176,49	170,25	154,00	191,28
<b>C33B910</b>	193,52	176,14	108,46	190,17	213,55	183,33	151,25	155,29
<b>C33B911</b>	1466,02	389,41	186,22	113,30	237954,27	100333,48	13501,02	114,07
<b>C33B912</b>	977,91	273,07	140,62	124,53	237140,86	101295,70	15726,96	149,54
<b>C33B913</b>	174,49	118,08	123,26	129,07	518952,00	409071,06	204694,14	127,82
<b>C33B914</b>	181,37	142,74	139,10	113,48	304350,88	315129,56	153252,58	185,45
<b>C33B915</b>	101,28	147,65	143,51	100,00	390477,25	362902,66	138398,56	112,22
<b>C33B916</b>	416,08	145,16	115,70	91,75	447815,47	404033,19	192941,55	167,07
<b>CD33 яванского макака</b>								
мкАт	60 нМ		6 нМ		0,6 нМ		0 нМ	
<b>C33B909</b>	180,33		135,33		115,73		124,03	
<b>C33B910</b>	202,42		135,18		116,71		175,97	
<b>C33B911</b>	17036,56		7729,14		1935,16		97,94	
<b>C33B912</b>	15070,88		7271,38		1726,03		124,69	
<b>C33B913</b>	40661,90		36920,95		35224,10		106,19	
<b>C33B914</b>	44964,85		33368,26		22086,01		86,76	
<b>C33B915</b>	37495,34		35692,21		36165,59		113,92	
<b>C33B916</b>	41004,43		33294,78		22790,61		104,43	

6 мкАт, связывающихся с CD33 на клетках, дополнительно характеризовали биофизическими методами полного кинетического анализа с рекомбинантным антигеном с применением способов, описанных выше и приведенных в таблице ниже. Из 6 протестированных мкАт 1 связывалось с CD33 человека с пикомолярной аффинностью (C33B912) и субмолярной аффинностью с CD33 яванского макака, тогда как 1 обладало очень высокой аффинностью к CD33 человека, но только наномолярной аффинностью к CD33 яванского макака (C33B911). Еще два клона были субнаномолярными в отношении CD33 как человека, так и яванского макака (C33B913 и C33B916), но ни один из них не находился в диапазоне C33B912.

Таблица 44

Полный кинетический анализ полученных из OMNIMouse мкАт

мкАт	ВКД CD33 человека с HSA			ВКД CD33 яванского макака с HSA		
	$k_a$ (1/М*с)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)	$k_a$ (1/М*с)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
C33B911	1.10E+06	4.14E-05	3.78E-11	1.15E+06	1.15E-03	1.00E-09
C33B912	1.42E+06	4.29E-05	3.02E-11	1.50E+06	6.50E-04	4.33E-10
C33B913	6.60E+05	6.40E-04	9.69E-10	2.56E+06	3.08E-04	1.20E-10
C33B914	4.44E+05	9.80E-03	2.21E-08	5.29E+05	2.33E-04	4.40E-10
C33B915	2.18E+05	9.89E-04	4.53E-09	3.81E+06	8.93E-05	2.34E-11
C33B916	6.27E+05	4.11E-04	6.55E-10	4.73E+05	4.03E-04	8.52E-10

Эксперимент по эпитоп-специфической сортировке проводили на 6 связывающихся с клетками мкАт, полученных из OMNIMouse, а также на нескольких контрольных мкАт, ранее идентифицированных в предшествующей кампании OMNIRat. Контрольные мкАт выбирали на основе их субнаномолярной аффинности к человеческому CD33 и количества отдельных групп эпитопов.

Программное обеспечение HtTools для сортировки назначает номера групп эпитопов в каждом эксперименте, и поэтому наличие нескольких контролей для уже определенных групп эпитопов играло решающую роль в перекрестном сравнении. Оба полученных из OMNIMouse клона с высокой аффинностью к CD33 человека (C33B911 и C33B912) были отсортированы с клонами из вышеуказанной группы 4 (группа 4 в данном эксперименте), а субнанолярный клон (C33B916) был отсортирован в 2 в данном случае вместе с C33B836 (группа 1 в вышеуказанном эксперименте).

Таблица 45

Группы эпитопов OMNIMouse мкАт к CD33

мкАт	ID V-области	Эпитопная группа
C33B915	C33F553	1
C33B916	C33F554	2
C33B836	C33F53	2
C33B914	C33F552	2
C33B913	C33F551	3
C33B806	C33F106	3
C33B911	C33F549	4
C33B912	C33F550	4
C33B778	C33F78	4
C33B830	C33F130	4
C33B782	C33F82	5
C33B792	C33F92	5
C33B799	C33F99	5
C33B760	C33F60	6
C33B777	C33F77	7

CD33 состоит из 2 доменов IgG, дистального по отношению к мембране V-домена и проксимального по отношению к мембране C2-домена. SNP rs12459419 могут вызывать селективный альтернативный сплайсинг транскрипта пре-мРНК CD33 для получения только C2-формы, экспрессируемой на клетках, и поэтому нацеливание на этот домен может обеспечить благоприятный клинический эффект. Для подтверждения того, какой из двух доменов мкАт был способен связываться, проводили скрининг скорости диссоциации согласно вышеописанному протоколу для 6 мкАт с самой высокой способностью связывания, которая охватывала 4 различных группы эпитопов, используя в качестве связывающих антигенов ВКД CD33 человека с HSA, V-домен CD33 человека с HSA, и C2-домен CD33 человека с HSA. Как показано в таблице ниже, оба клона были ранее сгруппированы в группу 4, которые связывались с доменом C2 huCD33, но не с V-доменом huCD33, тогда как клоны в группе 2 и 3 связывались с V-доменом, но не с C2-доменом. Два клона, сгруппированных в группу 5, не связывались ни с одним из доменов, и, следовательно, их точное положение связывания может охватывать два домена. В этот эксперимент включали три (3) доступных в продаже мкАт ((WM53 (EMD Millipore; г. Дармштадт, Германия), P67.7 (Biolegend, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) и клон LSBio 906 (LifeSpan Biosciences, г. Сатт, штат Вашингтон, США))), и все они продемонстрировали связывание с V-доменом, но не с C2-доменом. Из данных о группах эпитопов в табл. 37 и 40 по отношению к данным о связывании C2-домена в табл. 46 всего имеется 15 мкАт, которые могут потенциально связываться с C2-доменом в диапазоне аффинности от ~25 нМ до ~30 пМ на человеческом полноразмерном белке.

Таблица 46

Константы диссоциации для связывания доменов

	ВКД huCD33 с HSA	V-домен huCD33 с HSA	C2-домен huCD33 с HSA	Эпитопная группа
ID белка	$k_d$ (1/c)	$k_d$ (1/c)	$k_d$ (1/c)	

C33B912	1.29E-05	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	6.68E-05	4
C33B778	4.72E-05	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	2.57E-03	4
C33B782	2.58E-04	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	5
C33B792	4.27E-04	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	5
C33B836	5.52E-05	3.71E-05	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	2
C33B806	1.36E-03	3.18E-03	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	3
WM53	2.37E-03	3.78E-02	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	
P67.7	1.05E-03	2.43E-03	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	
Клон LSBio 906	2.45E-03	4.34E-02	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	

Для дополнительного подтверждения исследований *in vivo* и *in vitro* выбранные клоны (C33B836, C33B782, C33B778, C33B904, C33B806, C33B830, C33B937, C33B792, C33B760 и C33B777) были выбраны для масштабирования и обмена Fab-плечами, чтобы получить биспецифические молекулы с антителами к CD3. Клетки ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью  $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл в среду для экспрессии ExpiCHO™ и культивировали в поликарбонатных, одноразовых, стерильных, вентилируемых, встряхиваемых колбах Эрленмейера без дефлекторов в шейкере-инкубаторе при 37°C, 7% CO<sub>2</sub> (INFORS HT Multitron Pro). Для стандартного роста клеток во встряхиваемых колбах объемом 125 мл-2 л, скорость встряхивания устанавливали на 130 об/мин для шейкеров с диаметром встряхивания 19 мм. Клетки пересеивали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при  $4 \times 10^6$ - $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

За два дня до трансфекции клетки ExpiCHO-S™ высевали в концентрации  $1,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл для получения требуемого объема культуры. В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью  $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл. Для оптимальной трансфекции использовали стерильную плазмидную ДНК тяжелой и легкой цепей в концентрации >1 мг/мл в буфере TE (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТК, pH 8,0).

Клетки ExpiCHO-S™ трансфицировали в соответствии с протоколом производителя Max Titer Transfection (публикация ThermoFisher № MAN0014337). Все количества и объемы, указанные ниже, указаны в миллилитрах конечного объема трансфицированной культуры. Вкратце плазмидную ДНК разводили 0,04 мл холодной среды OptiPRO™ (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,125 мкг ДНК тяжелой цепи: 0,375 мкг ДНК легкой цепи: 0,5 мкг pAdvantage. 6,4 мкл реагента для трансфекции ExpiFectamine™ CHO разбавляли и осторожно перемешивали с 0,04 мл холодной среды OptiPRO и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamine™ CHO добавляли к разбавленной ДНК, осторожно перемешивали, а комплексы ExpiFectamine™ CHO/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После инкубации комплексы добавляли к клеткам ExpiCHO-S™ в шейкерной колбе и инкубировали в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37°C, 7% CO<sub>2</sub>.

Что касается протокола Max Titer, то в 1 день после трансфекции добавляли 6 мкл реагента ExpiFectamine™ CHO и 160 мкл питательного раствора ExpiCHO™, после чего колбу переносили в шейкер-инкубатор при 32°C в атмосфере 7% CO<sub>2</sub>. На 5 день после трансфекции в колбу снова добавляли 160 мкл питательного раствора ExpiCHO™ и возвращали в инкубатор с температурой 32°C при встряхивании. Культуру собирали на 12 день после трансфекции, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин и очищали с помощью фильтрующей капсулы с размером пор 0,2 мкм Acropak 1500 (Pall).

Экспрессированные антитела очищали из осветленных супернатантов с помощью MabSelect SuRe (GE Healthcare). Колонки MabSelect SuRe Protein A уравнивали 1× D-PBS, pH 7,2, перед загрузкой отдельных супернатантов культуры. Несвязанные белки удаляли интенсивной промывкой 1× D-PBS, pH 7,2. Связанные белки элюировали 0,1 M Na-ацетатом, pH 3,5. Фракции пика нейтрализовали 2,5 M Tris pH 7,2 и объединяли. Пулы нейтрализованных фракций или диализовали в 1× dPBS для анализов и биофизических характеристик, или использовали для сборки биспецифического антитела.

Концентрацию белка в каждом пуле элюирования определяли путем измерения поглощения при 280 нМ и рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности.

#### 6. Получение и функциональная оценка биспецифических антител к CD33×CD3.

##### 6.1. Обмен Fab-плечами с использованием очищенных исходных мкАт.

Для получения биспецифических антител к CD33×CD3 требуются два исходных мкАт, одно - специфическое к нацеливаемому плечу (например, CD33), а другое - специфическое к эффекторному плечу (например, CD3). мкАт к CD33 рекомбинировали с высокоаффинным (CD3B376: VH с SEQ ID NO: 652, и VL с SEQ ID NO: 661) или низкоаффинным плечами к CD3 (CD3B450: VH с SEQ ID NO: 657, и VL с SEQ ID NO: 678). Эти исходные мкАт (плечи к CD33 и CD3) находятся в формате IgG4 PAA (Labrijn et al., 2013), где нацеливающее исходное мкАт (CD33) содержит мутацию Genmab 409R (нативная аминокислота для IgG4), уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L и R409K. Одно из моноспецифических антител к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в Fc-областях. Моноспецифические антитела экспрессировали и очищали так, как описано выше. После очистки исходные антитела к CD33 смешивали с желаемым исходным антителом к CD3 в восстанавливающих условиях в 75 mM 2-МЕА (2-меркаптоэтиламина) и инкубировали при 31°C в течение 5 ч или при комнатной температуре в течение ночи. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, в которых установленное количество антитела к CD33 (например, 10 мг или ~74,6 наномоль) объединяли с антителом к CD3 (например, ~67,8 наномоль), причем антитело к CD33 добавляли при 6% избытке антитела к CD3. Концентрации маточных растворов антител к CD33 варьировались от 0,8 до 6 мг/мл, а объемы реакционной смеси для рекомбинации изменялись для каждого спаривания. Затем реакционные смеси для рекомбинации диализовали в течение ночи против PBS для удаления восстановителя. Реакции с биспецифическим антителом к CD33×CD3 выполняли с избытком антитела к CD33 (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к CD3, оставшегося после рекомбинации.

Полученные конечные биспецифические антитела к CD3×CD3 вместе с исходными мкАт (т.е. CD33, CD3 или "Null" (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в табл. 37.

Отобранные подходящие антитела к CD33 также объединяли с неуничтожающим плечом ("Null") для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA и в комбинации с плечами к CD3 CD3B219 или CD3B376-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3×Null) и CD3B510 (CD3B376×Null) соответственно; Плечи к CD33 комбинировали с B23B49 для получения CD33×Null, как показано в табл. 47.

Таблица 47

Биспецифические антитела к CD33×CD3

Биспецифическое антитело	Исходное	ID пепт. HC	Пепт. VH, SEQ ID NO	ID пепт. LC	Пепт. VL, SEQ ID NO
C3CB7	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287

## 045935

C3CB5	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB4	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB16	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB14	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB12	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB11	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB10	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB8	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB97	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB98	C33B830	C33H84	269	C33L66	287
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB99	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB100	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB101	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB102	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB103	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB104	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB105	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C33B941	C33B836	C33H80	267	C33L73	306

	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B942	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B943	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B944	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B945	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B946	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B947	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B948	C33B777	C33H65	256	C33L47	297
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B949	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
CD3B288	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
CD3B510	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB87	C33B903	C33H251	280	C33L117	319
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB88	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB89	C33B905	C33H253	282	C33L119	321
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB90	C33B907	C33H255	284	C33L121	323
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB91	C33B908	C33H256	285	C33L122	324
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB189	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661

Пепт.: пептид.

Нукл.: нуклеотид.

SEQ ID: SEQ ID NO.

6.2. Опосредованное CD33×CD3 снижение *ex vivo* blastов ОМЛ и активации Т-клеток в первичном образце ОМЛ.

Для дальнейшей оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33×CD3 был проведен анализ цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови пациента с ОМЛ с использованием четырех лучших антител (фиг. 61). В этом анализе различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови пациентов с ОМЛ на период в 48 ч без добавления дополнительных Т-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологических Т-клеток в крови пациента, через 48 ч образцы окрашивали CD3 PerCPy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD38 APC (все антитела были приобретены у Biolegend; г. Сан-Диего, штат Калифорния). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1× буфере для лизиса эритроцитов Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience). Затем образцы окрашивали буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень противоопухолевой цитотоксичности определяли путем первоначального количественного определения живых CD33<sup>+</sup> клеток в доле раковых клеток пациента с ОМЛ (определяемых как CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клетки) в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием

следующего уравнения:  $(\% \text{CD33}^+ \text{ в PBS/необработанный контроль} - \% \text{CD33}^+ \text{ в обработанном образце}) / (\% \text{CD33}^+ \text{ в PBS/необработанный контроль})$ . Активацию Т-клеток рассчитывали как процентную долю  $\text{CD25}^+$  событий в  $\text{CD3}^+$  фракции.

Как показано на фиг. 61, все антитела-лидеры к CD33, объединенные с любым из плеч к CD3 (CD3B376 и CD3B219), способствовали дозозависимому снижению общей цитотоксичности, которое коррелировало с активацией Т-клеток через 48 ч. Контрольные антитела с нулевым плечом (Null×CD3B219 и null×CD3B376) не продемонстрировали цитотоксичность в отношении опухолевых клеток или активацию Т-клеток. Этот результат также продемонстрировал, что биспецифические антитела CD33×CD3 действуют в аутологических условиях. Эти результаты отражают данные для 4 других образцов доноров с ОМЛ (данные не показаны). В табл. 48 приводится краткая информация по значениям  $\text{EC}_{50}$ , полученным с помощью мультиспецифических антител к CD33×CD3. Как видно из значений  $\text{EC}_{50}$ , С33В904, объединенное с любым из плечей к CD3 (С3СВ88, С3СВ189), а также С33В836, объединенное с любым из плечей CD3 (С3СВ7, С3СВ97), были наиболее мощными и эффективными антителами. Таким образом, эти 4 антитела были предметом дальнейших исследований.

Таблица 48

Анализ опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности *ex vivo*.

Сводка значений  $\text{EC}_{50}$  для 8 биспецифических антител к CD33×CD3

ID биспецифического Ат	$\text{EC}_{50}$ уничтожения первичных клеток ОМЛ (нМ)
С3СВ11	3,958
С3СВ12	2,635
С3СВ7	0,3315
С3СВ88	0,6722
С3СВ103	4,186
С3СВ102	4,973
С3СВ97	0,2316
С3СВ189	0,5782

6.3. Демонстрация того, что биспецифические антитела к CD33×CD3 связываются с С2-доменами CD33 и индуцируют цитотоксичность в отношении линий клеток, экспрессирующих однонуклеотидный полиморфизм (SNP) CD33.

Анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro* с использованием биспецифических антител к CD33×CD3.

Последние исследования продемонстрировали, что в ~50% популяции с ОМЛ присутствовал однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs12459419, что приводило к пропуску экзона 2 CD33, в результате которого возникала делеция V-домена CD33. Это исследование также продемонстрировало, что Mylotarg, который связывается с V-доменом CD33, не эффективен у пациентов, экспрессирующих SNP, и, следовательно, снижает риск рецидива и улучшает выживаемость примерно у 50% популяции с ОМЛ (Lamba et al., 2017, JCO, CD33 Splitting Polymorphism Determines Gemtuzumab Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia: Report From Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531). Принимая во внимание данные о Mylotarg в вышеупомянутом исследовании, были проведены анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro*, чтобы оценить, опосредуют ли отобранные антитела к CD33 (V-домен-связывающий С33В836 и С2-домен-связывающий С33В904) с плечами к CD3 (CD3B219 или CD3B376) уничтожение линий клеток, экспрессирующих SNP rs12459419. Вкратце эффекторные клетки (пан Т-клетки, приобретенные у компании Biological Speciality) собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% FBS (Invitrogen) для культуральных сред. Клетки-мишени (KG1, SH2 и OCIAML3) метили CFSE (Invitrogen) и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл в RPMI с 10% FBS. KG1, SH2 и OCIAML3 выбирали таким образом, чтобы они представляли собой дикий тип, гетерозиготный и гомозиготный по мутации CD33 SNP rs12459419 соответственно. Эффекторные клетки и меченные CFSE клетки-мишени смешивали в соотношении эффектор: мишень (E:T)=5:1 в стерильных 96-луночных круглодонных планшетах. В каждую лунку добавляли 10 мкл Fc Block (Fc-фрагмент РеоПро) вместе с аликвотой биспецифического антитела объемом 5 мкл в различных концентрациях. Культуры инкубировали при 37°C в течение 48 ч в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. через 48 ч к образцам добавляли окрашивающий буфер для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies), культуры инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, промывали и ресуспендировали в 100-200 мкл буфера для FACS. Вызванную препаратом цитотоксичность определяли, используя проточный цитометр CANTO II (BD Biosciences), и анализировали, используя программное обеспечение FlowJo или Dive (BD Biosciences). Интерес представляет популяция дважды позитивных клеток CFSE+/живые/мертвые+. Как показано на фиг. 63, в отличие от контролей с нулевым

плечом (null×CD3B219 и null×CD3B376), V-домен-связывающие и C2-домен-связывающие CD33×CD3 мультиспецифические антитела индуцировали клеточную цитотоксичность с перенаправлением Т-клеток для CD33+ ДТ для линии клеток KG1 с мутацией SNP rs12459419 через 48 ч. Напротив, в отличие от V-домен-связывающего C33B836 (C3CB97, C3CB7), только C2-домен-связывающие спаренные биспецифические антитела C33B904 (C3CB189, C3CB88) опосредовали цитотоксичность в отношении линий клеток SH2 и OCIAML3, которые были гетерозиготными или гомозиготными по мутациям rs12459419 SNP соответственно. По этой причине для дальнейшего анализа и определения характеристик использовали спаренные биспецифические антитела C33B904 (C3CB189, C3CB88). В совокупности эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела, связывающие C2-домен CD33, такие как спаренные биспецифические антитела C33B904, обладают потенциалом к демонстрации эффективности в более широкой группе пациентов с ОМЛ, чем конкурентные связывающие V-домен антитела к CD33.

6.4. Ex vivo CD33×CD3-опосредованное снижение введенных MOLM-13 и моноцитов в анализе цитотоксичности в отношении MOLM-13 в цельной крови ex vivo.

Для оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33×CD3 при устранении введенных клеток MOLM-13 и нормальных человеческих моноцитов был использован анализ цитотоксичности ex vivo с использованием нормальной цельной крови здорового человека с экзогенно добавленными MOLM-13 линии CD33<sup>+</sup> клеток ОМЛ. Подобно описанному выше эксперименту, различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови от 6 различных здоровых доноров людей на период 48 ч без добавления дополнительных Т-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологичных Т-клеток в крови донора. Перед разведением определяли содержание Т-клеток в крови каждого донора. Затем кровь разводили мечеными CFSE (Invitrogen) клетками MOLM-13 таким образом, чтобы соотношение эффектор: мишень (Е:Т) составляло 1:5, чтобы имитировать соотношение эффектор: мишень в образцах, полученных от пациентов с ОМЛ. через 48 ч образцы окрашивали CD3 PerCPy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD14 Pacific Blue (все антитела были приобретены у Biolegend). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1× буфере для лизиса эритроцитов Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience). Затем образцы окрашивали буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень противоопухолевой цитотоксичности определяли путем первого количественного определения живых CD33<sup>+</sup> клеток во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13 определяли путем подсчета процентного содержания мертвых CFSE<sup>+</sup> клеток. Цитотоксичность моноцитов рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием следующего уравнения: (% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в PBS/необработанный контроль-% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в обработанном образце)/(% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в PBS/необработанный контроль). Данные на фиг. 63 демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33×CD3 (одно и то же лидерное C33B904 к CD33, спаренное с любым плечом к CD3, CD3B376 и CD3B219) специфически индуцируют цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13 и CD33<sup>+</sup> моноцитов через 48 ч. В качестве отрицательных контролей биспецифических антител использовали контрольные антитела с нулевым плечом. Контроль с нулевым плечом продемонстрировал незначительную цитотоксическую активность в отношении MOLM-13 и CD33<sup>+</sup> моноцитов или ее отсутствие. Эти данные демонстрируют средние значения для 6 разных здоровых доноров. Средние значения EC<sub>50</sub> для цитотоксичности в отношении MOLM-13 и CD14<sup>+</sup> моноцитов приведены в табл. 49.

Таблица 49

Анализ опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности ex vivo.  
Сводка значений EC<sub>50</sub> для 2 биспецифических антител к CD33×CD3

ИД биспецифического антитела	EC <sub>50</sub> уничтожения MOLM13 (нМ)	EC <sub>50</sub> уничтожения CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> (нМ)
C3CB189	0,1677	1,156
C3CB88	0,671	0,506

6.5. Демонстрация видовой перекрестной реактивности биспецифических антител к CD33×CD3 в отношении яванского макака.

Опосредованное CD33×CD3 снижение ex vivo моноцитов в анализе цитотоксичности ex vivo с использованием цельной крови яванского макака.

Для демонстрации функциональной перекрестной реактивности и оценки цитотоксического потенциала биспецифических антител к CD33×CD3 при уничтожении нормальных моноцитов яванского макака использовали анализ цитотоксичности ex vivo с использованием цельной крови здорового яванского макака. Подобно описанному выше эксперименту, различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови от 6 различных здоровых доноров-яванских макаков на период 48 ч без добавления



дополнительных Т-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологичных Т-клеток в крови донора, через 48 ч образцы окрашивали CD3 PerCPy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD14 Pacific Blue (все антитела были приобретены у Biolegend, за исключением антитела к CD33, которое было приобретено у Miltenyi; Бергиш-Гладбах, Германия). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1× буфере для лизиса Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience) перед окрашиванием буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень цитотоксичности в отношении моноцитов определяли путем первого количественного определения живых CD33<sup>+</sup> клеток во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием следующего уравнения: (% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в PBS/необработанный контроль-% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в обработанном образце)/(% CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> в PBS/необработанный контроль). Активацию Т-клеток рассчитывали как процентную долю CD25<sup>+</sup> событий в CD3<sup>+</sup> фракции. Данные на фиг. 64 демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33×CD3 (одно и то же лидерное С33В904 к CD33, объединенное с плечом к CD3, CD3В376 или CD3В219) специфически индуцируют клеточную цитотоксичность в отношении CD33<sup>+</sup> моноцитов, а также активацию Т-клеток через 48 ч. Контрольные антитела с нулевым плечом использовали в качестве отрицательных контрольных биспецифических антител, и они демонстрировали незначительную цитотоксичность или активность Т-клеток или ее отсутствие. В табл. 50 приведены средние значения для 6 различных доноров-яванских макаков.

Таблица 50

Анализ опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности *ex vivo*.  
Сводка значений EC<sub>50</sub> для 2 биспецифических антител к CD33×CD3

ID белка по а.к.	EC <sub>50</sub> уничтожения CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> (нМ)	EC <sub>50</sub> активации Т-клеток (нМ)
С3СВ189	3,60	0,02
С3СВ88	0,89	0,02

6.6. Эффективность С3СВ189 и С3СВ88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG.

Эффективность С3СВ189 и С3СВ88 оценивали на стандартных ксенотрансплантатах человеческих клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) MOLM-13, трансфицированных люциферазой, у самок мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG), гуманизированных 20 миллионами Т-клеток. Животных рандомизировали в n=10/группу с помощью биоломинесцентной визуализации в реальном времени (BLI) на 5-й день после в/в имплантации опухоли. С3СВ189 и С3СВ88 в концентрациях 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг или контрольное антитело к Null×CD3 в концентрации 0,5 мг/кг вводили и/п каждые 3-4 дня в течение 6 недель.

На 13 день после имплантации опухоли, когда в каждой группе оставалось по меньшей мере восемь животных, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI), определяемое по результатам биоломинесценции. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для С3СВ189 (фиг. 65) и С3СВ88 (фиг. 67) во всех концентрациях по сравнению с контролем к Null×CD3. С3СВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 76, 100 и 82% соответственно, а С3СВ88 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 100, 100 и 91% соответственно по сравнению с контролями, обработанными Null×CD3.

Лечение С3СВ189 и С3СВ88 привело к снижению опухолевой нагрузки и увеличению продолжительности жизни (ILS) по сравнению с 16-дневной медианой выживаемости в контрольной группе Null×CD3. В зависимости от доз медиана выживаемости животных, получавших лечение С3СВ189, составила 19-27,5 дней (фиг. 66), а у животных, получавших лечение С3СВ88, медиана выживаемости составила 26-28,5 (фиг. 68) дней по всем дозам. С3СВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг привело к увеличению продолжительности жизни на 19, 72 и 50% соответственно, а С3СВ88 привел к увеличению продолжительности жизни на 63, 78 и 72% соответственно по сравнению с контрольной группой.

## 7. Антитела к TMEFF2.

### 7.1. Генерация антигенов.

Человеческий внеклеточный домен (ВКД) TMEFF2 получали по последовательности с UniProt с номером доступа Q9UIK5. Конструкт ВКД была сконструирован с последовательностями 6-гистидиновой метки (SEQ ID NO: 596) и авидиновой метки на С-конце (конструкт TMEW1; SEQ ID NO: 578). Конструкт, содержащий домены FS2 и EGF (аминокислоты 151-320) сконструировали в виде слияния человеческого сывороточного альбумина (HSA) с последовательностями 6-гистидиновой метки (SEQ ID NO: 596) и авидиновой метки (конструкт TMEW7; SEQ ID NO: 579). Конструкт, содержащий мембранный проксимальный домен TMEFF2 (остатки 230-320), сконструировали с 6-гистидиновой меткой (SEQ ID NO: 596) (конструкт TMEW19; SEQ ID NO: 580) или сливали с крысиным Fc IgG1 с гистидиновой меткой (конструкт TMEW20; SEQ ID NO: 581). Остатки 230-320

TMEFF2 содержат EGF домен, который охватывает остатки 261-301 TMEFF2. Экспрессионные конструкции ВКД человеческого TMEFF2 временно трансфицировали в клетки, полученные из HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific), с использованием Expiectamine в соответствии с протоколом производителя. Перед сбором клетки инкубировали в течение 5 суток при 37°C в атмосфере с 8% CO<sub>2</sub> на орбитальной качалке. Экспрессирующие клетки удаляли центрифугированием, а растворимые белки TMEFF2 с His-метками очищали от среды с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных металлах с использованием смолы Fast Flow Ni Sepharose 6 (GE Healthcare) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией на Superdex 200 (SEC) (GE Healthcare) в фосфатном буфере Дульбекко с pH 7,2 (1× DPBS). Аминокислотные последовательности генерированных антигенов показаны в табл. 51.

Таблица 51

ID белка по а.к.	Описание	Аминокислотная последовательность
TMEW1 (SEQ ID NO: 578)	TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка	FPTSLSDCQTPGTWNCSGYDDRENDLFLCDTNT CKFDGECLRIGDVTVCVCQFKCNDYVVPVCGSN GESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDA GSGSGDGVHEGSGETSQKETSTCDICQFGAEC EDAEDVWVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDN ACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRCDNTTTTTS EDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYN GFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGQHCEK KDYSVLYVVPVPGVRFQYVGGGSHHHHHHLNDI FEAQKIEWHE
TMEW7 (SEQ ID NO: 579)	FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avi-метка	SGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWVCN IDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQ EKIEVMSLGRCDNTTTTTSKSEDGHYARTDYAE
		NANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSI NMQEPSCRC DAGYTGQHCEK KDYSVLYVVPVGP VRFQYVGGSGSENLYFQVRRSSDAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC TVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLOHKD DNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRIIPYGYAPELLTFAKRYKAAFTCCQAA DKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQ KFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICENQ DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGE YKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH EKTPVSDRVTCCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD DKETCFAEEGKLVAAASQAALGLGGGSHHHHH HLNDIFEAQKIEWHE
TMEW19 (SEQ ID NO: 580)	spTMEFF2(230-320)G3S-H6	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREH HIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAG YTGQHCEK KDYSVLYVVPVPGVRFQYVGGGSHH HHHH
TMEW20 (SEQ ID NO: 581)	spTMEFF2(230-320)-G3S-крысиный IgG1Fc	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREH HIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAG YTGQHCEK KDYSVLYVVPVPGVRFQYVGGGSPR NCGGDCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQ TRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTRFRCK VTSAAFPSPIEKTISKPEGRQVPHVYTMSPKKEE MTQNEVSITCMVKGFPDIIYVEWQMNGQPQE NYKNTPTMDTDGSYFLYSKLVKKEKWQQG NTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGKGGGSHH HHHH

## 7.2. Создание антител к TMEFF2.

Создание антител с использованием трансгенных крыс, экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека (OmniRat®) Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный

локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V<sub>H</sub>S, все человеческие сегменты D и J<sub>H</sub> в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C<sub>H</sub>), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V<sub>λ</sub>s, связанных с J<sub>λ</sub>-C<sub>λ</sub>, и 16 V<sub>λ</sub>s, связанных с J<sub>λ</sub>-C<sub>λ</sub>). (см. например, Osborn et al. (2013), J. Immunol., 190(4):1481-1490). Соответственно крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации с образованием высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими варибельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO 14/093908.

OmniRat иммунизировали конструктором TMEFF2 человека FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avi-метка (TMEW7, SEQ ID NO: 579) и стимулировали конструктором spTMEFF2 (230-320)G3S-FdgG1 крысы (TMEW20, SEQ ID NO: 581). После 89 дневной схемы иммунизации собирали лимфатические узлы крыс и использовали их для создания гибридом, а супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с белком человеческого TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка (TMEW1) с помощью ИФА и/или SPARCL (люминесценция в аналитическом реагенте пространственной близости). Несколько супернатантов были отобраны для вторичного ELISA и SPARCL-скрининга связывания с ВКД TMEFF2, FS2-EGF или доменом EGF только TMEFF2. На основании результатов скрининга несколько клонов гибридомы секвенировали, экспрессировали и охарактеризовали по функциональности.

Создание антител из библиотек фаговых дисплеев Fab, связывающие TMEFF2, были выбраны стандартными методами из двух наборов библиотек фагового дисплея de novo pIX, как описано в Shi et al., J. Mol. Biol., 397:385-96, 2010; и WO 2009/085462). Вкратце два набора библиотек, называемые V3.0 и V5.0, создавали путем диверсификации человеческих каркасов, в которых гены VH зародышевой линии IGHV1-69\*01, IGHV3-23\*01 и IGHV5-51\*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGHJ-4 посредством петли H3 (миниген IGHJ-6 также использовался в V5.0), а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии 012 (IGKV1-39\*01), L6 (IGKV3-11\*01), A27 (IGKV3-20\*01) и B3 (IGKV4-1\*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации были выбраны положения в варибельных областях тяжелой и легкой цепей вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, которые часто контактируют с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, встречающимися в каждом положении в семействах генов зародышевой линии IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию в петле H3 создавали с использованием синтетических петель коротких или средних размеров длиной 7-14 аминокислот для библиотек V3.0 и длиной 6-19 аминокислот для библиотек V5.0. Распределение аминокислот в H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Каркасы, использованные для создания библиотек, получали название в соответствии с их происхождением от человеческого гена зародышевой линии VH и VL. В обоих наборах V3.0 и V5.0 каждую из трех библиотек тяжелых цепей объединяли с четырьмя легкими цепями зародышевой линии или библиотеками легких цепей зародышевой линии для создания 12 уникальных комбинаций VH:VL для каждого набора библиотек, используемых в экспериментах по отбору.

#### Клонирование V-области.

Общую РНК из лизатов клеток гибридомы фага очищали с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Полученную РНК количественно определяли с использованием Drop Sense и либо хранили при -80°C, либо использовали для синтеза кДНК с использованием системы синтеза First-Strand методом ОТ-ПЦР (Invitrogen). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров, отожженных с константными областями тяжелых, каппа-и лямбда-цепей соответственно. Реакционную смесь для ОТ-ПЦР, содержащую до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси дНТФ, реакционного буфера, 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мкл, Invitrogen) и SuperScript™ III RT (200 Ед/мкл, Invitrogen, кат. № 18080-051), инкубировали при 50°C в течение 50 мин и при 85°C в течение 5 мин. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20°C или использовали непосредственно для ПЦР-амплификации. Реакцию ПЦР проводили с использованием полимеразы Platinum Pfx (Invitrogen). Фрагменты v-области амплифицировали путем отжига прямого и обратного праймеров с лидерными последовательностями и константными областями тяжелой, каппа-и лямбда-цепей, соответственно, с использованием оптимизированных условий ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали, аминокислотные последовательности выделенных v-областей оптимизировали по кодонам и клонировали в вектор экспрессии на основе pUnderd, несущий константную область IgG4 с мутациями S228P, F234A и L235A (изотип IgG4PAA).

#### Трансфекция и очистка Expi293 в малых масштабах.

Выбранные антитела, идентифицированные в ходе операций иммунизации или фагового дисплея, клонировали и экспрессировали как IgG1PAA и очищали в небольшом объеме 2 мл. Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью 1,25×10<sup>5</sup>-2,25×10<sup>5</sup> жизнеспособных клеток/мл в среде

экспрессии Expi293™ и культивировали в встряхиваемых колбах объемом 125 мл-2 л при 37°C, 7% CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при  $3 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью  $3 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в соответствии с протоколом трансфекции производителя (ThermoFisher, публикация № MAN0007814). Культуру собирали на 6 сутки после трансфекции путем центрифугирования при 850xG в течение 15 мин перед очисткой. Антитела очищали из осветленных супернатантов с использованием смолы mAb Select Sure (GE Healthcare) и диализовали в PBS. Концентрации белка определяли путем измерения при длине волны A280 на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

### 7.3. Определение характеристик антител к TMEFF2.

Антитела к TMEFF2 связывают TMEFF2 с высокой аффинностью.

Связывание выбранных антител IgG4PAA к TMEFF2 с ВКД TMEFF2 (TMEW1: TMEFF2-FL ECD-His-Avi-метка) и/или мембранной проксимальной областью (TMEW19: spTMEFF2(230-320)G3S-H6) оценивали с использованием Proteon (TMEB674, TMEB675, TMEB 565 и TMEB570) или Biacore SPR (TMEB762 и TMEB757). Кинетические параметры связывания выбранных антител приведены в табл. 52. Было обнаружено, что антитела к TMEFF2 связываются как с мембранной проксимальной областью ВКД TMEFF2, так и с TMEFF2 с пиколярной аффинностью.

Таблица 52

Антитело	Антиген	Домен TMEFF2	$k_a$ (1/M*c)	Kd (1/c)	KD (нМ)
TMEB674	TMEW1	ВКД	2.01E+06	1.62E-04	0,10
TMEB674	TMEW19	MP*	8.37E+05	1.75E-04	0,20
TMEB675	TMEW1	ВКД	2.65E+06	1.53E-04	0,10
TMEB675	TMEW19	MP	9.72E+05	1.58E-04	0,20
TMEB565	TMEW1	ВКД	3.84E+05	9.13E-06	0,02
TMEB565	TMEW19	MP	7.77E+05	6.39E-06	0,01
TMEB570	TMEW1	ВКД	4.64E+05	5.13E-05	0,11
TMEB570	TMEW19	MP	7.62E+05	4.67E-05	0,06
TMEB762	TMEW1	ВКД	5.41E+05	1.74E-04	0,32
TMEB757	TMEW1	ВКД	5.42E+05	1.67E-04	0,31

\*MP: мембранная проксимальная область

### ППР ProteOn.

Связывание мкАт к TMEFF2 с ВКД и мембранной проксимальной областью TMEFF2 человека измеряли методом ППР ProteOn (Bio-Rad). Очищенные мкАт (разведенные до конечной концентрации 1 мкг/мл в PBST) использовали в качестве лигандов в анализе и иммобилизовали посредством захвата Fc к антителам козьего античеловеческого (GAN) Fc IgG. Для аминного связывания GAN Fc IgG смесь 1:1 EDC (40 мМ) и NHS (10 мМ) смешивали непосредственно перед инъекцией для активации поверхности чипа и вводили в вертикальную ориентацию. Затем антитело GAN-Fc (30 мкг/мл) в ацетатном буфере (pH 5,0) пропускали по поверхности в течение 300 с при 30 мкл/мин в вертикальной ориентации. Впоследствии любые оставшиеся реакционноспособные карбоксильные группы на поверхности деактивировали путем инъекции 1 М этаноламина (pH 8,5) в той же ориентации. Антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл для иммобилизации. Антитела протекали по поверхности в горизонтальном направлении. ВКД TMEFF2 человека или проксимальную область мембраны в серии 3-кратных разбавлений 5 концентраций (самая высокая концентрация в диапазоне 100-600 нМ) протекали в качестве аналита в вертикальной ориентации для связывания с захваченными молекулами. Буферный образец также вводили в 6<sup>-й</sup> канал в вертикальном направлении для контроля любого смещения исходного сигнала. Стадии ассоциации и диссоциации для всех концентраций отслеживали в течение 3 и 30 (или 15) мин соответственно, при скорости потока 100 мкл/мин. Связывающую поверхность регенерировали для следующего цикла взаимодействия с использованием 18-секундного импульса 0,8% фосфорной кислоты для удаления связанного антигена.

Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) сигналы пустого канала (где через чип пропускали только PBST) для коррекции неспецифического смещения исходного уровня.

### ППР Biacore 8K.

Связывание мкАт к TMEFF2 с ВКД TMEFF2 человека измеряли методом ППР Biacore 8 K. Формат анализа заключался в захвате мкАт с помощью поверхности Fc человека высокой плотности с

последующей инъекцией титрования концентрации TMEFF2 человека с помощью метода кинетики одного цикла. Козьи антитела к Fc IgG человека (Jackson Immunoresearch, № по кат. 109-005-098) напрямую иммобилизовали посредством аминного связывания в концентрации 30 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,5, на проточных ячейках 1 и 2 на чипе датчика CM5 (GE) со скоростью потока 30 мкл/мин в буфере HBSP (GE). мкАт захватывали на поверхности антител к Fc IgG человека с концентрацией 0,5 мкг/мл (~200-300 ОЕ) на проточной кювете 2. Затем рабочий буфер заменяли на HBSP+100 мкг/мл BSA. TMEFF2 ВКД с концентрацией 30 нМ в серии разведений в 3 раз вводили от низкой до высокой концентрации с использованием метода кинетики с одним циклом. Скорость диссоциации отслеживали через 30 мин после последнего введения или введения наибольшей концентрации, а затем поверхность регенерировали, используя 0,8% фосфорную кислоту (Bio-Rad). Также проводили холостой анализ буферного раствора, захватывая те же мкАт и используя те же условия анализа образца. Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) эталонная проточная кювета 1 вычтена из проточной кюветы 2 и 2) с контрольным буфером из экспериментального прогона. Обработанные данные для всех концентраций для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения оценок констант кинетики ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и аффинности (KD).

Термостабильность антител к TMEFF2.

TMEB675 продемонстрировало более низкий, чем обычный профиль термостабильности методом ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия) с началом разворачивания  $T_m=52^{\circ}\text{C}$  и первым тепловым переходом ( $T_{ml}$ ) при  $=60,4^{\circ}\text{C}$ . Более точное исследование последовательности TMEB675 (см. пример 4) показало наличие соматических гипермутаций (SHM) в каркасной области тяжелой и легкой цепей. Несколько реконструированных вариантов субклонировали, экспрессировали, очищали и профилировали методом ДСК. Полученные мкАт TMEB762 и TMEFB757 продемонстрировали желаемый профиль термостабильности ( $T_{ml}=69,4^{\circ}\text{C}$  и  $T_{ml}=69,7^{\circ}\text{C}$  соответственно). По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P, P20L и H81Q, тогда как TMEFB757 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P и P20L. По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в легкой цепи: A1D и A91P, тогда как TMEFB757 имело модификацию A91P в легкой цепи. Нумерация остатков соответствует схеме Кабат. Кинетические параметры связывания TMEB675, TMEB762 с ВКД TMEFF2 приведены в табл. 52.

7.4. Определение структурных характеристик антител к TMEFF2.

Последовательности кДНК и трансляции аминокислот антител получали с использованием стандартных методик. После определения последовательности полипептидов некоторые кДНК антител, кодирующие вариабельные области или полноразмерные антитела, были оптимизированы по кодонам с помощью стандартных способов экспрессии в увеличенном количестве.

В табл. 53 приведены аминокислотные последовательности HCDR1 и HCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 54 приведены последовательности HCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 55 приведены аминокислотные последовательности LCDR1 и LCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 56 приведены аминокислотные последовательности LCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 57 приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 58 приведены SEQ ID NO: тяжелой и легкой цепей выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 59 приведены аминокислотные последовательности тяжелой цепи выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 60 приведены аминокислотные последовательности легких цепей выбранных антител к TMEFF2.

В табл. 61 приведены SEQ ID NO: полинуклеотидов, кодирующих различные цепи антитела к TMEFF2.

Таблица 53

мкАт	Последовательность HCDR1	HCDR1, SEQ ID NO:	Последовательность HCDR2	HCDR2, SEQ ID NO:
TMEB675	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584
TMEB570	SYYSIS	583	GIIPISGRANYAQKFQ G	585
TMEB674	SYSMS	582	VISGGGSFTSYADSVK G	586
TMEB565	SYYSIS	583	GIIPISGRANYAQKFQ G	585
TMEB762	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584
TMEB757	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584

Таблица 54

мкАт	Последовательность HCDR3	HCDR3, SEQ ID NO:
TMEB675	MPLNSPHDY	587
TMEB570	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB674	MPLNSPHDC	17
TMEB565	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB762	MPLNSPHDY	587
TMEB757	MPLNSPHDY	587

Таблица 55

мкАт	Аминокислота LCDR1	LCDR1 SEQ ID NO:	Аминокислота LCDR2	LCDR2, SEQ ID NO:
TMEB675	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB570	RASQSVSTYYLA	19	GASYRAT	21
TMEB674	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB565	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB762	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB757	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588

Таблица 56

мкАт	Аминокислота LCDR3	LCDR3, SEQ ID NO:
TMEB675	LQDYNALYALT	22
TMEB570	QQYGHSPIT	23
TMEB674	LQDYNYSLT	24
TMEB565	LQDYNALYALT	22
TMEB762	LQDYNPLT	603
TMEB757	LQDYNPLT	603

Таблица 57

Антител о	Названи е VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Названи е VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
TMEB675	TMEH411	EVQLLESGGGLVQRGGSLRPSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLR	25	TMEL127	AIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRNDLGYWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ	28

		AEDTAVYYCA R MPLNSPHDY WGQGTLVTVSS			DYNYALTFGG GTKVEIK	
TMEB5 70	TMEH39 6	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKVS CKASGGTFSSY YISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIS GRANYAQKFQ GRVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYCAR DGYSSGRSTTY AFDYWGQGT L VTVSS	589	TMEL11 2	EIVLTQSPGTL LSPGERATLSC RASQSVSTYYL AWYQQKPGQA PRLIYGASYR ATGIPDRFSGS SGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQ QYGHSPITFGQ GTKVEIK	29
TMEB6 74	TMEH41 0	EVQLLESGGGL VQPPGSLRLS CAASGFTFSSYS MSWVRQAPGK GLEWVSVISGG GSFTSYADSVK GRFTISRDN SN NTLYLQMS SLR AEDTAVYY CAR MPLNSPH DCW GQGTLV TVSS	27	TMEL12 6	AIQMTQSPSSL S ASVGD RVTITC RASQGI RNDLG WYQQK PGKAP KLLIYA AASSL QSGVPS RFGSG SGSGT DFTLT ISSLQ PEDFAT YYCLQ DYNYSL TFGGG TKVEIR	30
TMEB5 65	TMEH39 6	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKVS CKASGGTFSSY YISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIS GRANYAQKFQ GRVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYCAR DGYSSGRSTTY AFDYWGQGT L VTVSS	589	TMEL11 1	EIVLTQSPGTL LSPGERATLSC RASQSVATYYL AWYQQKPGQA PRLIYGASSRA TGIPDRFSGS SGSGTDF TLTISR LE PEDFA VYYCQ YGYNP ITFGQ G TKVEIK	31
TMEB7 62	TMEH45 9	EVQLLESGGGL VQPPGSLRLS CAASGFTFSSYS MSWVRQAPGK GLEWVSVISGS GGFTDYADSVK GRFTISRDN SK NTLYLQ MNSLR AEDTAVYY CA R MPLNS PHDY WGQGTLV TVSS	604	DL3L12 9	DIQMTQSPSSL S ASVGD RVTITC RASQGI RNDLG WYQQK PGKAP KLLIYA AASSL QSGVPS RFGSG SGSGT DFTLT ISSLQ PEDFAT YYCLQ DYNYPL TFGGG TKVEIK	607
TMEB7 57	TMEH46 0	EVQLLESGGGL VQPPGSLRLS CAASGFTFSSYS MSWVRQAPGK GLEWVSVISGS GGFTDYADSVK GRFTISRDN SK NTLYLH MNSLR AEDTAVYY CA R MPLNS PHDY WGQGTLV TVSS	612	B76L85	AIQMTQSPSSL S ASVGD RVTITC RASQGI RNDLG WYQQK PGKAP KLLIYA AASSL QSGVPS RFGSG SGSGT DFTLT ISSLQ PEDFAT YYCLQ DYNYPL TFGGG TKVEIK	613

Таблица 58

Антитело	Название VH	Название VL	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC, SEQ ID NO:
ТМЕВ675	ТМЕH411	ТМЕL127	32	35
ТМЕВ570	ТМЕH396	ТМЕL112	33	36
ТМЕВ674	ТМЕH410	ТМЕL126	34	37
ТМЕВ565	ТМЕH396	ТМЕL111	33	38
ТМЕВ762	ТМЕH459	DL3L129	614	615
ТМЕВ757	ТМЕH460	B76L85	616	617

Таблица 59

Белок HC, SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HC
32 (HC ТМЕВ675)	evqllesggglvqrggsrlrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dnskntlylhmnslraedtavyyccarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrstsstaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltlvkgfypsdiawesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
33 (HC ТМЕВ570, ТМЕВ565)	qvqlvqsgaevkpkpssvkvscasggtfssyiswvrqapgglewmggiipisgranyaqkfqrvt itadeststaymelssrsedtavyccardgyssgrsttyafdywgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrsts staalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntk vdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdg vevhnaktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlp psqee mtknqvsltlvkgfypsdiawesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqegnv fscsvmhealthnhytqkslslslgk
34 (HC ТМЕВ674)	evqllesggglvqppggsrlrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewsvvisgsggftsdyadsvkgrftis rdnsntlylqmnsrlraedafyccarmplnsphdcwgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrstsstaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltlvkgfypsdiawesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
614 (HC ТМЕВ762)	evqllesggglvqppggsrlrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dnskntlylqmnsrlraedtavyyccarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrstsstaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltlvkgfypsdiawesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
616 (HC ТМЕВ757)	evqllesggglvqppggsrlrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dnskntlylhmnslraedtavyyccarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrstsstaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltlvkgfypsdiawesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk



Таблица 60

SEQ ID NO: белка LC	Аминокислотная последовательность LC
35 (LC TMEB675)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyclqdynyaltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec
36 (LC TMEB570)	eivltqspgtlslsperatlscrasqsvstyylawyqqkpgqaprlliygasyratgipdrfsqsgsgtdftltisr lepedfavyyccqyghspitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqwk vdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec
37 (LC TMEB674)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyclqdynyaltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqwk vdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec
38 (LC TMEB565)	eivltqspgtlslsperatlscrasqvatyylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsqsgsgtdftltisr lepedfavyyccqygnpitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqwk vdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec
615 (LC TMEB762)	diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec
617 (LC TMEB757)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapkliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqskdstyslstltskadyekhkv yacevthqglsspvtksfnrgec

Таблица 61

Антитело	κДНК VH с SEQ ID NO:	κДНК VL с SEQ ID NO:	κДНК HC с SEQ ID NO:	κДНК LC с SEQ ID NO:
TMEB675	39	42	46	49
TMEB570	40	43	47	50
TMEB674	41	44	48	51
TMEB565	40	45	47	590
TMEB762	618	619	620	621
TMEB757	622	623	624	625

SEQ ID NO: 39 (κДНК VH TMEB675)

Gaggtgcagctgctggaagcggcggaggcctggtgcagagaggaggaggcctgagaccagctgtgccgccagcggctt

caccttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcggc  
 ttcaccgattacgccgacagcgtgaaggcaggttcaccatcagcaggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctg  
 agggccgaggacaccgctgtactactgcgccagatgccctgaacagccctcacgactactgggccaagggaacctgtgtaccg  
 tgtccagc

SEQ ID NO: 40 (κДНК VH TMEB570, TMEB565)

Caggtgcagctggtgcagagcggcggcgaagtgaaaaaccggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcagcggcggc  
 gcaccttcagctctattacattagctgggtgcgccagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
 tgctaattatgcgcgaaattcagggccgctgaccattaccgctgatgaaagcaccagaccgcgtatataggaactgagcagcctgcgc  
 agcgaagataccgctgtattattgcgcgacggctacagtagtgagcgtagcacaacatagcattgactattggggccagggc  
 acctggtgaccgtgtcagc

SEQ ID NO: 41 (κДНК VH TMEB674)

Gaagtgcagctgctggagagcggaggagcagctggtgcagcctctggcggaaacctgagactgagctgcggcctagcgg  
 cttcacccttcagcagctacagcatgagctgggtgagacagcctctggcaaggcctggagtgggtgagcgtgatcagcggcggaggca  
 gctttaccagctacccgacagcgtgaaggcaggttcaccatcagcagggaacaacagcaaacacctgtacctgcagatgagcagc  
 ctgagggccgaggacaccgcttctactactgcgccagatgccctgaacagccccatgactgtggggcagaggcaccctgtgtac  
 cgtgagcagc

SEQ ID NO: 42 (κДНК VL TMEB675)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtggggcagagggtgacctcacctgcagggccagcca  
 gggcatcagaaacgacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggccccaaagctgctgatctacggccagcagcctgcagag  
 cggagtgcctagcaggttcagcggaaagcggcagcggcaccgacttcacctgacctcagcagcctgcagcccaggacttcgccacct  
 actactgcctgcagactacaactacgccctgacattcggcggcggcaccaggtggagatcaag

SEQ ID NO: 43 (κДНК VL TMEB570)

Gaaattgtgctgaccagagcccgggaccctgagcctgagcccggggaacgcgcacctgagctgccgcgagacca  
 gagcgtttccacatactacctggcgtgtatcagcagaaccggccaggcggcgcctgctgattacgggtgctcctatcgcgcgacc  
 ggcatccggatcctttagcggcagcgggtccggcaccgattttacctgacctagccgctggaaccggaagattttgggtgtattatt  
 gccagcagtagcgtcacagcccattactttggccaggcaccaaaagtggaaatcaaa

SEQ ID NO: 44 (κДНК VL TMEB674)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtggggcagagggtgacctcacctgcagggccagcca  
 gggcatcaggaaacacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggccccaaagctgctgatctacggccagcagcctgcagag  
 cggagtgcctagcaggttcagcggcagcggaaagcggcaccgacttcacctgacctcagcagcctgcagcccaggacttcgccacct  
 actactgcctgcagactacaactacagcctgacctcggcggcggcaccaggtggagatcagg

SEQ ID NO: 45 (κДНК VL TMEB565)

Gaaattgtgctgaccagagcccgggaccctgagcctgagcccggggaacgcgcacctgagctgccgcgagacca  
 gagcgtttccacatactacctggcgtgtatcagcagaaccggccagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
 ggcatccggatcctttagcggcagcgggtccggcaccgattttacctgacctagccgctggaaccggaagattttgggtgtattatt  
 gccagcagtagcgtataaccaattacctttggccaggcaccaaaagtggaaatcaaa

SEQ ID NO: 46 (κДНК HC TMEB675)

gaggtgcagctgctgaaagcggcggaggcctggtgcagagaggaggaaacctgagaccagctgtgccccagcggcct  
 caccttcagcagctacagcatgagctgggtcagcagggccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcggc  
 ttcaccgattacgccgacagcgtgaaggcaggttcaccatcagcaggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctg

agggccgaggacaccgccgtgactactcgcaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaaccctggtgaccg  
 tctcagcgctccaccaaggccatccgtctccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgctgggtgcc  
 tggtaaggactactccccgaaccggtgacggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccgctgctac  
 agtctcaggaactactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggcacgaaaacctacacctgcaactgtagatcaaa  
 gcccagcaacaccaagggtgacaagagagttgagtcgaataatggtccccatgccaccatgccagcacctgagccgcccgggga  
 ccatcagctctctgtcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtggtggtggacgtgagcca  
 ggaagaccgccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggagggtgataatgccaagacaagccgaggagagcagttcaac  
 agcagctaccgtggtcagcgtctcaccgtcctgaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagg  
 cctcccgtctccatcgagaaacctctcaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagg  
 agatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaggctctaccccagcagatcggcgtggagtgaggagacaatggcag  
 ccgggagaacaactacaagaccgctcccgtgctgactccgacggctctctctctacagcaggtaccgtggacaagagcagg  
 tggcaggagggaatgtctctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaacctactacacagaagagcctctcctctggtgtaa  
 a

SEQ ID NO: 47 (κДНК HC TMEB570, TMEB565)

cagggtcagctggtgagcagcggcgcggaagtgaanaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaacgagcggcg  
 gacctctcagctcttaftacattagctgggtgcccagcggcgccggccaggcctggaatggatgggtggcattatcccaatcagtgggc  
 tcttaattatgcgcagaaatfcaggcccgctgaccattaccctgatgaaagcaccagcaccgcgtataggaaactgagcagcctgccc  
 agcgaagataccggtgtattatgcccgcgcgacggctacagtagtgacgtagcacaacatacgcattgactatggggccagggc  
 accctggtgaccgtgctgagctctccaccaagggccatccgtctccccctggcgccctgctccagagcacctccgagagcacagcc  
 gccctgggtgctgcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctggaactcagcggccctgaccagcggcgtgcacacctc  
 ccggctgctctacagctcctcagactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggcacgaaaacctacacctgca  
 acgtagatcaacaagcccagcaacaccaagggtgacaagagagttgagtcgaataatggtccccatgccaccatgccagcacctgag  
 gccgcccggggaccatcagctctctgtcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtg  
 tggacgtgagccaggaagccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggagggtgataatgccaagacaaaaccgcccga  
 ggagcagttcaacagcacgtaccgtggtcagcgtctcaccgtcctgaccaggaactggctgaaaggcaaggagtacaagtcaagg  
 tctcaacaaaagcctcccgtctccatcgagaaaacctctcaaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccc  
 ccatcccagagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaagcctctccccagcagatcggcgtggagtgaggga  
 gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccgctcccgtggtgactccgacgctctctctctacagcaggttaacct  
 ggacaagagcaggtggcaggggaatgtctctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaacctactacacagaagagcctctc  
 cctgctctgggtaaa

SEQ ID NO: 48 (κДНК HC TMEB674)

gaagtgagctgctggagagcggaggaggactggtgagcctcctggcggaagcctgagactgagctgcccgtagcgg  
 cttcacctcagcagctacagcatgagctgggtgagacagcctcctgcaaggcctggagtgggtgagcgtgacagcggcggaggca  
 gcttaccagctacccgacagcgtgaaggcaggttcaccatcagcagggacaacagcaacaacacctgtacctgagatgagcagc  
 ctgaggccgagacaccgctctactactgcccaggatgccctgaaacgccccatgactgctgggacagggcacctggtgac  
 cgtgagcagcgttccaccaaggccccatccgtctccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcccccgtggt  
 gctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgctggaactcagcggccctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgct  
 tacagctcaggaactactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggcacgaaaacctacacctgcaactgtagatca  
 caagcccagcaacaccaagggtgacaagagagttgagtcgaataatggtccccatgccaccatgccagcacctgagcccccggg  
 ggacatcagctctctgtcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtgacgtga

gccaggaagaccccgaggccagttcaactggctacgtggatggcgtggaggcgataatccaagacaagcccgaggaggagcagtt  
 caacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctaccgtcctgaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaaca  
 aggcctcccgtctccatcgaaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccagg  
 aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgtcaaaaggcttaccaccagcgacatcgccgtggagtgggaggaatggg  
 cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtgactccgacggctcctctctctacagcaggctaacctgggacaagagc  
 aggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtctctggg  
 taaa

SEQ ID NO: 49 (κДНК LC TMEB675)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtgtagcgtggcgacaggggtgacctacacctgcaggccagcca  
 gggcatcagaaacacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccagcagcctgcagag  
 cggagtgcctagcaggtcagcggaaagcggcagcggcaccgacttaccctgacctcagcagcctgcagcccaggacttcccacct  
 actactgctgcaaggactacaactacgccctgacattggcggcgccaccaagggtggagatcaagcgtacgtgtgctgacctgtctt  
 calcttcccgcctatgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag  
 tggaaaggtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcagcagcaagcagcagcctacagcctcagca  
 gcacctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaagctctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcggccgtcaca  
 aagagctcaacaggggagaggtgt

SEQ ID NO: 50 (κДНК LC TMEB570)

Gaaattgtgctgaccagagcccgggaccctgagcctgagcccggcggaacgcgcacctgagctgccgcgagccagag  
 cgtttccatactacctggcgtgtatcagcagaaacggccagggcggcgcctgctgatttacggctcctctatcgcgcagccgacatc  
 cggatcgttttagcggcagcgggtccggcaccgattttaccctgaccattagccctggaaccggaagatfttgcggtgattattgccagagta  
 cggctcacagcccattactttggccaggcaccaaagtggaaatcaaacgtacgggtggctgcacctgtcttcatctcccgcctgatgag  
 cagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaaaggtgataacgccctcaat  
 cgggtaactcccagagaggtgtcacagagcagcagcaagcagcagcctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagacta  
 cgagaacacaagctctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcggccgtcacaagagctcaacaggggagaggtgt

SEQ ID NO: 51 (κДНК LC TMEB674)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtgtagcgtggcgacaggggtgacctacacctgcaggccagcca  
 gggcatcaggaacacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccagcagcctgcagag  
 cggagtgcctagcaggtcagcggcagcggaaagcggcaccgacttaccctgaccttccagcctgcagcccaggacttcccacct  
 actactgctgcaaggactacaactacagcctgaccttggcggcgccaccaagggtggagatcagcgtacgggtgctgcacctgtctt  
 calcttcccgcctatgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacag  
 tggaaaggtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcagcagcaagcagcagcctacagcctcagca  
 gcacctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaagctctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcggccgtcaca  
 aagagctcaacaggggagaggtgt

SEQ ID NO: 590 (κДНК LC TMEB565)

Gaaattgtgctgaccagagcccgggaccctgagcctgagcccggcggaacgcgcacctgagctgccgcgagccag  
 agcgttcccactatcttgcgtgtatcagcagaaacggccagggcggcgcctgctgatttacgggtgcatcctcccgtgcgaccggc  
 attccggatcgttttagcggcagcgggtccgcaccgattttaccctgaccattagccctggaaccggaagatfttgcggtgtattattgccag  
 cagtagcgtataaccaattacctttggccagggcaccaaagtggaaatcaaacgtacgggtgctgcacctgtcttcatctcccgcctc  
 tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagtggaaggtgataacg  
 cctccaatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagcagcagcaagcagcagcctacagcctcagcagcaccctgacgctgagca

aagcagactacgagaacacaaaagtctacccctgcgaagtacccatcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggag  
agtgt

SEQ ID NO: 618 (κДНК VH TMEB762)

gaggtgcagctgctgaaagcggcgaggcctgtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccccagcggcttc  
acctcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagcccctggcaaaaggactggagtggtgagcgtgattagcggcagcggcgtt  
caccgattacggcagacgctgaaggcaggttcaccatcagcagggacaatagcaaacacctgtacctgcagatgaacacctga  
ggccgaggacaccgctgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacactactggggccagggaacctgtgacctg  
gtccagc

SEQ ID NO: 619 (κДНК VL TMEB762)

gacatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtatgctggcgacaggggtgacctacacctgcaggccagccag  
ggcatcagaaacgacctgggtggtaccagcagaagcccggcaaggccccaaagtctgatctaccccagcagcctgcagagc  
ggagtgctcagcaggttcagcggaaagcggcagcggcaccgactcaccctgacctcagcagcctgcagcccaggacttcgccaacta  
ctactgctcagcagactacaactacccccgtacattcggcggcgccaccaaggtggagatcaag

SEQ ID NO: 620 (κДНК HC TMEB762)

gaggtgcagctgctgaaagcggcgaggcctgtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccccagcggcttc  
acctcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagcccctggcaaaaggactggagtggtgagcgtgattagcggcagcggcgtt  
caccgattacggcagacgctgaaggcaggttcaccatcagcagggacaatagcaaacacctgtacctgcagatgaacacctga  
ggggccaggacaccgctgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacactactggggccagggaacctgtgacctg  
gtccagcgttccaccaagggccatccgtctccccctggcgcctgtccaggagcaccctccgagagcacagccctgggctgct  
gttcaaggactactccccgaaccgggtgacggtgctgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggtgtctaca  
gtctcagcagctactcctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcacgaaaacctactgtcaacgtatgatacacaag  
cccagcaacaccaaggtggacaagaggtgagtcacaatattgtccccatgccaccatgccagcactgagccgccgggggac  
catcagctctctgttcccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtgacgtgagccag  
gaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggtgagtgatgagtgagtgatgataatgccaaagacaagccgaggagcaggtcaaca  
gcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccctcctgcaccagcagctggctgaaaggcaagagatcaaaaggtcaaggtctccaacaaaggc  
ctcccgtctcctcagcagaaaacctcctcaaaagcgaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccagagga  
gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaagccttctaccccagcagatcggctggagtgaggagcaatgggcagc  
cggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacgctccttctctctctacagcaggctaaccgtggacaagaagcagat  
ggcagggagggaatgtctctcatgctccgtgatgatgagcctctgcacaaccctacacagaagagcctctcctctgtctgtggttaa

SEQ ID NO: 621 (κДНК LC TMEB762)

gacatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtatgctggcgacaggggtgacctacacctgcaggccagccag  
ggcatcagaaacgacctgggtggtaccagcagaagcccggcaaggccccaaagtctgatctaccccagcagcctgcagagc  
ggagtgctcagcaggttcagcggaaagcggcagcggcaccgactcaccctgacctcagcagcctgcagcccaggacttcgccaacta  
ctactgctcagcagactacaactacccccgtacattcggcggcgccaccaagggtgagatcaagcgtacgggtgctgacctctgtctt  
atctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagagccaaagtacagt  
ggaaagtgataacgcccctcaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcagcagcaaggacagcacctacagcctcagcag  
caccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaaagctcagcctgcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcgtcaca  
agagcttcaacaggggagagtgtag

SEQ ID NO: 622 (κДНК VH TMEB757)

gaggtgcagctgctgaaagcggcgaggcctgtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccccagcggcttc

acctfcagcagctacagcatgagctgggtcaggcaggccctggcaaggactggagtggtgagcgtgattagcggcagcggcgctt  
 caccgattaccccacagcgtgaaaggcaggttaccatcagcagggacaatagaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctga  
 gggccgaggacaccgctgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcagactactgggccagggaacctgtgaccgt  
 gtccagc

SEQ ID NO: 623 (кДНК VL TMEB757)

gccatccagatgaccagagccctgagcctgagcgtagcgtggggcagaggtgacctcacctgcagggccagccag  
 ggcacgaaacgacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacccgccagcagcctgcagagc  
 ggagtgccctagcaggttcagcggaaaggcagcggcaccgactcaccctgacctcagcagcctgcagcccaggacttccaccta  
 ctactgcctgcaggactacaactaccctgacattcggcggcggcaccaaggaggagatcaag

SEQ ID NO: 624 (кДНК HC TMEB757)

gaggtgcagctgctgaaagcggcggagcctgtgcagcccggaggaacctgagactcagctgtcccggcagcggctt  
 acctfcagcagctacagcatgagctgggtcaggcaggccctggcaaggactggagtggtgagcgtgattagcggcagcggcgctt  
 caccgattaccccacagcgtgaaaggcaggttaccatcagcagggacaatagaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctga  
 gggccgaggacaccgctgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcagactactgggccagggaacctgtgaccgt  
 gtccagcgttccaccaaggcccatcctcttcccctggcgcctgctccaggagcaccctccgagagcacagccgctgggctgctt  
 ggtcaagactacttcccgaaccggtgacggtgctgtggaactcagggcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctaca  
 gtctcaggactacttccctcagcagcgtggtgaccgtccctccagcagctgggcagaaaactacactgcaacgtatgacacaaag  
 cccagcaaaccaagggtgacaagaggtgagtcacaatggtccccatgccaccatgccagcactgaggccggggggac  
 calcagcttctgttcccccaaaaccaaggacactctcatgacttcccggaccctgaggtcacgtgctggtgggacgtgagccag  
 gaagaccggaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgcaagacaagccggggagagcagttcaaca  
 gcacgtaccgtgtgtagcgtcctcaccgctcaccagcagcgtgctaacggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaggc  
 ctcccgtctccatcagaaaaccttccaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagga  
 gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctaccaccagcagatcctggagtgaggagcaatgggcagc  
 cggagaacaactacaagaccacgctcccgtggtgactccgacggctcttctctctacagcaggtaccgtggacaagagcagat  
 ggcaaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacagaagagcctctcccgtctgtggtaaa

SEQ ID NO: 625 (кДНК LC TMEB757)

gccatccagatgaccagagccctgagcctgagcgtagcgtggggcagaggtgacctcacctgcagggccagccag  
 ggcacgaaacgacctgggctgtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacccgccagcagcctgcagagc  
 ggagtgccctagcaggttcagcggaaaggcagcggcaccgactcaccctgacctcagcagcctgcagcccaggacttccaccta  
 ctactgcctgcaggactacaactaccctgacattcggcggcggcaccaaggaggagatcaagcgtacggtggctgaccatctgtctt  
 atctcccgccatctgatgagcagttgaaactggaactgctctgtgtgctgctgtaataactctatcccagagagccaaagtacgt  
 ggaaagggtgataaccctccaatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagcagggacagcaaggacacactacagcctcagcag  
 caccctgacgtgagcaagcagactacgagaaacacaagtctacgctgcgaagtcacctcagggcctgagctgcccgtcaca  
 agagctcaacaggggagagtgtag

Каркасы выбранных антител к TMEFF2 приведены в табл. 62.

Таблица 62

Антитело	Каркас VH	Каркас VH, SEQ ID NO:	Каркас VL	Каркас VL, SEQ ID NO:
TMEB675	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB570	VH1_1-69	54	VKIII_A27	591
TMEB674	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB565	VH1_1-69	54	VKI_L11	55
TMEB762	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB757	VH3_3-23	53	VKI_L11	55

**SEQ ID NO: 53** (каркас VH3\_3-23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS  
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVGQGLTLTVSS

**SEQ ID NO: 54** (каркас VH1\_1-69)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAIS WVRQAPGQGLEWMG  
GIIPIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

**SEQ ID NO: 55** (каркас VKI\_L11)

aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsfsgsgg  
tdftltisslqpedfatyyc lqdynyp

**SEQ ID NO: 591** (каркас VKIII\_A27)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY  
GASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSP

#### 7.5. Картирование эпитопов антител к TMEFF2.

Картирование эпитопов TMEB570 и TMEB675 проводили с Н/D обменом. TMEW1 (SEQ ID NO: 578) в этих анализах использовали в качестве источника TMEFF2.

10 мкг TMEW1 в 130 мкл контрольного буфера (50 мМ фосфата, 100 мМ натрий хлорида при pH 7,4) денатурировали путем добавления 130 мкл 4 М гуанидин гидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5) и инкубации смеси в течение 3 мин при 10°C. Затем смесь подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII на колонке, используя колонку пепсин/протеаза XIII собственной упаковки (мас./мас., 1:1) (2,1×30 мм). Полученные пептиды анализировали с помощью системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ Waters Acquity, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Пептиды разделяли на колонке C8 размером 50×1 мм с градиентом 16,5 мин от 2-34% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Растворитель А представлял собой 0,2% муравьиную кислоту в воде. Клапан инжектора и колонка пепсина/протеазы XIII и их соответствующие соединительные трубки располагаются внутри охлаждаемого корпуса, где поддерживается температура 10°C. Второй переключающий клапан, колонка C8, и их соответствующие соединительные трубки из нержавеющей стали находятся внутри другого охлаждаемого корпуса с циркуляцией, где поддерживается температура -6°C. Идентификацию пептида осуществляют путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью TMEW1 с использованием программы Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составлял 7 ч./млн и 0,02 Да соответственно.

10 мкл TMEW1 (5 мкг) или 10 мкл TMEW1 и TMEB570, или смеси TMEB675 (5:15 мкг) инкубировали с 120 мкл буферного раствора для мечения оксидом дейтерия (50 мМ натрий фосфата, 100 мМ натрий хлорида при pH 7,4) в течение 0, 30, 360, 3600 или 14400 с при 10°C. Водород-дейтериевый обмен (Н/D) в каждый момент времени проводили в двух повторностях. Водород-дейтериевый обмен останавливали добавлением 130 мкл 4 М гуанидингидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5). Затем образцы после остановки обмена наносили на колонку расщепления с пепсином/протеазой XIII и анализировали с помощью ЖХ-МС, как описано выше. Масс-спектры регистрировали только в режиме МС.

Исходные данные МС обрабатывают с помощью программного обеспечения HDX WorkBench, предназначенного для анализа данных МС Н/D обмена (Pascal et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2012, 23 (9), 1512-1521). Уровни дейтерия вычисляют с помощью средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t0). Около 97-99% белка можно было картировать относительно конкретных пептидов. Кривые накопления дейтерия показали значительную разницу в наклоне за время обмена для пептидов.

Эпитоп TMEB570: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 235-249 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 575), например, остатки HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 592) в мембранной проксимальной области была защищены от Н/D обмена при связывании с TMEB570.

Эпитоп TMEB675: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 252-268 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 575), например, остатки DAGYTGQHCCKDYSLV (SEQ ID NO: 600) в мембранной проксимальной области были защищены от Н/D обмена при связывании с TMEB675.

Таким образом, эпитопные остатки TMEB570 TMEFF2 охвачены HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 592), а эпитопные остатки TMEB675 охвачены DAGYTGQHCCKDYSLV (SEQ ID NO: 600). Оба антитела связывались с TMEFF2 в мембранной проксимальной области.

#### 7.6. Создание биспецифических антител к TMEFF2×CD3.

Выбранные моноспецифические антитела к TMEFF2 и CD3 (см. примеры 1-7) экспрессировали как IgG4/К. Замены F405L и R409K (нумерация ЕС) были внесены в антитела к CD3, в то время как антитела к TMEFF2 имели IgG4 дикого типа. В дополнение к заменам в положениях 405 и 409 были

сконструированы мкАт IgG4 с заменой S228P, F234A и L235A.

Моноспецифические антитела экспрессировали и очищали с помощью стандартных способов, применяя колонку Protein A (колонку HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела TMEFF2×CD3 создавали, комбинируя моноспецифическое мкАт к TMEFF2 и моноспецифическое мкАт к CD3 при обмене Fab-плечами *in vitro*, как описано в международной патентной публикации № WO2011/131746. Вкратце около 1-20 мг/мл каждого антитела в молярном соотношении 1:1 в PBS, pH 7-7,4, и 75 mM 2-меркаптоэтанолamina (2-МЕА) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с применением стандартных способов.

Биспецифические антитела после обмена Fab-плечами *in vitro* дополнительно очищали стандартными способами, применяя гидрофобную хроматографию, чтобы свести к минимуму остаточное содержание исходных антител к TMEFF2 и CD3.

В табл. 63 и 64 показаны полученные биспецифические антитела.

Таблица 63

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к TMEFF2/плечо к CD3)	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCD R1	LCD R2	LCD R3
TMCB132	TMEB675	582	584	587	18	588	22
	CD3B376	662	663	664	671	673	690
TMCB131	TMEB570	583	585	16	19	21	23
	CD3B376	662	663	664	671	673	690
TMCB150	TMEB762	582	584	587	18	588	603
	CD3B376	662	663	664	671	673	690

Таблица 64

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к TMEFF2/плечо к CD3)	VH	VL	HC	LC
TMCB132	TMEB675	25	28	32	35
	CD3B376	652	661	640	676
TMCB131	TMEB570	589	29	33	36
	CD3B376	652	661	640	676
TMCB150	TMEB762	604	607	614	615
	CD3B376	652	661	640	676

7.7. Определение характеристик биспецифических антител к TMEFF2×CD3 Анализ чистоты методом аналитического ультрацентрифугирования (AUC).

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) позволяет определить размер, форму, состояние агрегации и обратимое взаимодействие макромолекул в растворе. Скорость осаждения (SV) представляет собой методику AUC, позволяющую перевести градиент концентрации макромолекулы к внешнему радиусу держателя образца (клетки) при вращении центрифуги. Это позволяет определять коэффициент осаждения, который является фактором размера и формы молекулы, а также является уникальным для каждой молекулы. Для этой цели использовали прибор Beckman Optima AUC. Образцы загружали в ячейки центрифуги, оснащенные сердцевинами Beckman 1,2 см (с номинальным интервалом 50 тыс. об/мин) и кварцевыми окошками. Клетки собирали и вращали до 130 фунтов. Клетки центрифуги помещали в ротор An-50 (отверстие 8) или An-60 (отверстие 4) и помещали в камеру AUC. Перед началом пробега температуру AUC уравнивали до 20,5°C в течение по меньшей мере 1 ч с помощью ротора в камере. Анализ проводили при 40 тыс. об/мин для образца мкАт со счетчиком сканирований (250 сканирований), частотой сбора данных (90 с), разрешением данных (10 мкМ), длиной волны 280 нМ. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для прямого подбора границ SEDANAL. Измеряли чистоту биспецифического антитела TMCB150 и его исходных мкАт. TMCB150 продемонстрировало наличие 97,1% мономера, 2,8% димерного мономера и отсутствие агрегации, что установлено по AUC, удовлетворяющей приемлемым критериям для временно экспрессируемого исследуемого материала для дополнительной биофизической характеристики. TMEB762 продемонстрировало содержание мономера 95,5%, димера 4,5% и отсутствие агрегации, тогда как CD3B376 продемонстрировало содержание мономера 97,7% и димера 2,2% без агрегации. Уровни агрегатов, составляющие >5% минимальной двухстадийной очищенной молекулы, могут оказывать значительное влияние на биологическую активность, растворимость, стабильность и срок хранения.



Конформационная стабильность биспецифических антител к TMEFF2/CD3 по результатам ДСК.

Тепловое разворачивание TMCB150 определяли с помощью ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии), показывающей начало разворачивания  $T_m=52,6^{\circ}\text{C}$ , первый тепловой переход ( $T_{m1}$ ) при  $61,8^{\circ}\text{C}$ , второй тепловой переход ( $T_{m2}$ ) при  $67,6^{\circ}\text{C}$  и третий тепловой переход ( $T_{m3}$ ) при  $75,5^{\circ}\text{C}$ . На основании профиля теплового перехода в исходное антитело (антитело к TMEFF2, TMEB762 и антитело к CD3, CD3B376), который оценивается с помощью ДСК до,  $T_{m1}$  в TMCB150 соответствует разворачиванию FAB CD3B376, а  $T_{m3}$  в TMCB150 соответствует переходам разворачивания Fab TMEB762.

Стабильность в сыворотке.

Разрабатывается анализ стабильности в сыворотке для оценки свойств лидерных кандидатов на неспецифическое или нецелевое связывание с компонентами сыворотки человека. Это может спрогнозировать плохие фармакокинетические свойства и свойства биораспределения. Связывание и стабильность TMCB150 оценивают как в буфере, так и в человеческой сыворотке с использованием способа флуоресцентной хроматографии. Биспецифическое антитело метили конъюгатом Alexa Fluor 488 (Invitrogen kit в соответствии с инструкциями производителя), инкубировали в буфере Herpes и человеческой сыворотке (Sigma, кат. № H4522) при 4 и  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 2 дней, а затем анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ с использованием системы для ВЭЖХ Agilent, оснащенной флуоресцентным детектором. Процент агрегатов рассчитывают по суммарной площади под кривой каждого пика. TMCB150 продемонстрировало агрегацию 2,4% в буфере Herpes в нулевой момент времени и агрегацию 2,0 и 1,3% через двое суток при 4 и  $37^{\circ}\text{C}$  соответственно. В человеческой сыворотке TMCB150 продемонстрировало агрегацию 1,7% в нулевой момент времени и агрегацию 1,1% через двое суток при 4 и  $37^{\circ}\text{C}$ .

Неспецифическое связывание.

Неспецифическое связывание лидерной молекулы с неродственными поверхностями определяется с помощью биосенсорной технологии (Biacore 8 K). Антитело пропускают через поверхности ППР, покрытые неродственными белками. Если антитело проявляет существенное связывание с данными нерелевантными поверхностями, предполагается, что оно будет иметь слабые свойства *in vivo* и вызывать проблемы при производстве. Лидерная молекула тестируется в конечной концентрации 1 мкМ. К нерелевантным поверхностям относятся отрицательно заряженный белок (ингибитор соевого трипсина), положительно заряженный белок (лизозим и  $\beta$ -дефензин), гидрофобный (Rh-интегрин a4b7), человеческий IgG, липкий белок (Rh-CD19). В данном эксперименте использовали надлежащие контроли. Лидерная молекула течет по двум поверхностям: одна является немодифицированной, а другая имеет непосредственно иммобилизованную молекулу. Уровень единицы ответа (RU) определяют путем вычитания RU немодифицированной поверхности из RU исследуемой поверхности. RU TMCB150 и исходных мкАт приведены ниже в таблице. Единица ответа  $\geq 100$  прогнозирует высокий риск неспецифического связывания с заряженными/гидрофобными поверхностями/поверхностями IgG, которые могут создавать проблемы при производстве и преобразовывать в плохие ФК свойства. Ни одно из антител не демонстрирует неспецифического связывания с нерелевантными поверхностями, прогнозирующими низкий риск производства и *in vivo*.

Таблица 65

	STI	В-дефензин-3	IgG человека	Лизоцим	rh-интегрин a4b7	rh-CD19
TMCB150	1,6	6,4	7,5	4,2	0	3,4
TMEB762	0	4,1	8,4	4,6	0	3,3
CD3B376	19,5	3,1	0,4	0,2	0	0

Стабильность при высокой концентрации.

Многие моноклональные антитела готовят в высокой концентрации ( $\geq 100$  мг/мл) для уменьшения объема инъекции для облегчения подкожного введения. Кроме того, во время процесса очистки все моноклональные антитела подвергают воздействию временно высоких концентраций ( $\geq 50$  мг/мл). Следовательно, стабильность при высокой концентрации является критическим свойством качества этих молекул. Концентрирование проводят с использованием центрифужных ультрафильтрационных аппаратов с мембранами MWCO 30 кДа. От 5,1 до 5,3 мг каждого белка сначала разводили до той же исходной концентрации и центрифугировали при  $4000 \times g$  с 15-минутными интервалами. В конце каждой стадии центрифугирования в течение 15 мин концентраторы извлекают из центрифуги и регистрируют визуальную оценку оставшегося объема образца.

Концентрацию измеряют с помощью прибора SoloVPE. Концентрированные образцы инкубировали при 4 и  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 2 недель, отбирали аликвоты с временными интервалами для проверки

целостности с помощью аналитической SEC. ТМСВ150 и исходные мкАт (CD3В376 и ТМЕВ762) концентрировались нормально. Конечная концентрация ТМСВ150 составляла 99,4 мг/мл, а конечная концентрация исходных мкАт составляла 52,2 мг/мл (ТМЕВ762) и 52,6 мг/мл (CD3В376). Концентрация оставалась одинаковой в течение 2 недель при 4 и 40°C, что указывает на то, что молекулы обладают хорошими собственными свойствами без возможности агрегации или адсорбции в пробирках Eppendorf. % видов (А: Агрегат; М: Мономер; F: Фрагмент), измеренный по сумме пиков SEC, представлен ниже в таблице. При высокой концентрации молекулы интактны и содержат 4-5% агрегатов и ≤0,3% фрагментов после хранения в течение 2 недель при 40°C, что прогнозирует хороший срок хранения.

Таблица 66

	Начальный момент			2 недели, 4 °С			2 недели, 40 °С		
	А	М	F	А	М	F	А	М	F
ТМСВ150	0,8	99,2	0	1,4	98,6	0	3,6	96,1	0,3
ТМЕВ762	2,5	97,5	0	2,7	97,3	0	3,1	96,9	0
CD3В376	1,1	98,9	0	2,5	97,5	0	5,1	94,7	0,2

Определение аффинности биспецифического антитела к ТМЕFF2/CD3 с помощью кинетического эксклюзионного анализа (KinExA).

Для измерения в растворе равновесной аффинности  $K_D$  биспецифического мкАт ТМСВ150 и его двухвалентного исходного мкАт ТМЕFF2 ТМЕВ762 к внеклеточному домену (ВКД) использовали прибор KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Inc.). Готовили последовательные разведения человеческого внеклеточного домена (ВКД) ТМЕFF2 с постоянной концентрацией мкАт к ТМЕFF2 в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4, 0,1% BSA и 0,02% NaN<sub>3</sub>. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре до достижения равновесия на основе связывающих взаимодействий. Продолжительность инкубации определяли с помощью моделирования программного обеспечения KinExA. Гранулы получали путем прямой ковалентной иммобилизации ТМЕFF2-ВКД путем аминного связывания на предварительно активированных гранулах, состоящих из сополимера бис-акриламид/азолактон (Pierce Biotechnology, Inc.). После инкубации образцы анализировали на приборе KinExA для оценки свободного антитела в смеси путем пропускания смеси через модифицированные ТМЕFF2 гранулы и обнаружения захваченного антитела с использованием вторичного антитела с флуоресцентной меткой. Данные аппроксимировали с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения KinExA Pro.

Таблица 67

образец мкАт	$K_D$ , пМ	95% ДИ, $K_D$ , пМ
ТМСВ150	63,6	55,8-71,9
ТМЕВ762	46,1	38,0-55,1

Измерение аффинности связывания биспецифического антитела к ТМЕFF2/CD3 с N-концевым пептидом CD3ε.

Константы кинетической скорости измеряли методом ППР, выполненные на биосенсорных поверхностях Biacore 8 K (GE Healthcare) и антител к человеческому Fc. Антитела к человеческому иммуноглобулину ковалентно связывали с поверхностью сенсорного чипа CM4 (GE Healthcare). Представляющие интерес антитела захватывали сенсорным чипом иммуноглобулина человека с последующей инъекцией N-концевого пептида CD3ε в различных концентрациях в буферный раствор HEPES, содержащий 0,05% поверхностно-активного вещества P20 (Tween™ 20) и 100 мкг/мл BSA. Поверхность регенерировали, вводя 2 инъекции 30 мкл 0,8% фосфорной кислоты со скоростью 100 мкл/мин. Приведенные данные представляют собой разность сигнала SPR между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные пустой инъекции из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Данные анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях (глобальная аппроксимация) моделью связывания 1:1, используя программное обеспечение Biaevaluation (Biacore, Inc.). Данные представлены в виде среднего значения+95% ДИ (доверительный интервал), которое вычисляют по значению t для 95% ДИ\* ст. откл./квадрат числа повторов.

Таблица 68

образец мкАт	Средн. Значение $k_{on}$ (1/М*с)	Средн. Значение $k_{off}$ (1/с)	Средн. Значение $K_D$ , пМ	95% ДИ, $K_D$ , пМ
ТМСВ150	3.57E+04	1.03E-03	28,7	24,4,-34,3
CD3В376	4.33E+04	1.17E-03	26,9	21,1,-34,4

7.8. Биспецифические антитела к TMEFF2×CD3 эффективны для опосредованного Т-клетками уничтожения клеток рака предстательной железы.

Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток рака предстательной железы.

Выбранные биспецифические антитела к TMEFF2×CD3 оценивали на их способность опосредовать опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток предстательной железы.

Опосредованное Т-клетками уничтожение биспецифических антител к TMEFF2×CD3 измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки.

Замороженные пан CD3<sup>+</sup> Т-клетки (Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие TMEFF2 (LNCaP-AR), культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавки (Life Technologies). Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (E:T) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для селекции и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспаза NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела TMEFF2×CD3 получали в 2× конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 мин инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience), в котором поддерживали температуру 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны описания обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые 6 ч, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(ах), содержащей (их) самую высокую концентрацию тестируемого(-ых) соединения(ий).

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием описания соответствующей обработки. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в виде зависимости от Log<sub>10</sub> нМ соединения. EC<sub>50</sub> для каждой кривой дозы, в наномолях (нМ), регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (аппроксимация параметров 4, наименьшие обычные квадраты). Каждый анализ содержал минимум три биологических повторности, и каждую клеточную линию тестировали с использованием Т-клеток от пяти здоровых доноров. Данные дополнительно анализировали с помощью доклинической статистики с использованием нелинейной регрессионной модели.

Биспецифические антитела к TMEFF2×CD3 эффективны в моделях опухолей предстательной железы *in vivo*.

Выбранные биспецифические антитела исследовали в модели рака предстательной железы LNCaP *ex vivo* у самцов мышей NSG. Для исследования клетки 10 LNCaP в 50% Cultrex в количестве 0,2 мл/животное вводили путем подкожной инъекции в правый бок на 0 сутки. Животных рандомизировали, когда опухоли достигали объема приблизительно ~100-150 мм<sup>3</sup>, и на 15 сутки вводили внутривентриально 20<sup>6</sup> Т-клеток/мышь. В каждой группе было по десять животных. Обработка антителами начиналась через 1-3 суток после инъекции Т-клеток. Антитела вводили внутривентриально дважды в неделю. Перед введением дозы все животные получали IVIG+Fc Block. Объем опухоли и массу тела оценивали дважды в неделю до достижения опухолью ~1200 мм<sup>3</sup>. Группы лечения приведены в табл. 69. В этих анализах в качестве отрицательного контроля использовали CD3-связывающее плечо и нулевое плечо, которое связывается с gp120 ВИЧ.

Таблица 69

Группа	Обработка	Доза
1	CD3xNull	5 мг/кг
6	ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376)	5 мг/кг
7	ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376)	0,5 мг/кг
8	ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376)	5 мг/кг
9	ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376)	0,5 мг/кг

В табл. 70 приведен процент ингибирования роста опухоли на 38 сутки в каждой группе после имплантации опухоли.

На фиг. 71 показано уменьшение среднего объема опухоли с течением времени после имплантации опухоли. На фиг. 72 показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,05, 0,1 или 0,5 мг/кг ТМЕВ762×CD3В376.

Таблица 70

Обработка	% TGI на 38 сутки
CNT07008 (Null × CD3)	
ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376), 5 мг/кг	48
ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376), 0,5 мг/кг	47,7
ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376), 5 мг/кг	23,3
ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376), 0,5 мг/кг	35

Эффективность ТМЕВ762×CD3В376 (ТМСВ150) также оценивали в развившихся ксенотрансплантатах LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1wj1</sup>/SzJ (NSG), гуманизированных Т-клетками 20е6. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. ТМЕВ762×CD3В376 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело null×CD3В376 в дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 5 недель. На 35 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере восемь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для ТМЕВ762×CD3В376 в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг, но не в дозах 0,05 мг/кг по сравнению с контролем null×CD3 (фиг. 72, p≤0,0001). ТМЕВ762×CD3В376 при 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 110, 88 и 25% соответственно по сравнению с контрольными образцами, получавшими лечение Null×CD3. Лечение ТМЕВ762×CD3В376 приводила к семи и трем полным ответам в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг соответственно. Подкожные опухоли LNCaP измеряли штангенциркулем два раза в неделю, а результаты представляли в виде среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>)±СОС (оставались ≥8 мышей на группу).

Активация Т-клеток в ответ на введение ТМСВ132.

Активацию Т-клеток в клетках рака предстательной железы LNCaP измеряли посредством проточной цитометрии, в частности, путем оценки положительности CD25 Т-клеток CD3+/CD8+ у 6 отдельных нормальных здоровых доноров (9642, 9672, 9762, 9772, 9832, 9852) через 72 ч после лечения ТМСВ132 (фиг. 74). Активацию CD3+ пан-Т-клеток, добавленных в соотношении эффектор: мишень 3:1, наблюдали в ответ на введение ТМСВ132 на клетки рака предстательной железы LNCaP.

Опосредованная Т-клетками цитотоксичность ТМСВ132 in vitro.

Анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности использовали для оценки цитотоксического потенциала ТМСВ132 in vitro с использованием долговременной визуализации на платформе Incucyte. ТМСВ132 исследовали в ТМЕFF2-положительной клеточной линии LNCaP в присутствии выделенных пан-человеческих CD3+ Т-клеток от здоровых доноров при соотношении эффектор: мишень (Эффектор: Мишень) (соотношение Е: Т) 3:1. Уничтожение клеток путем апоптоза контролировали путем измерения сигнала флуоресценции для активной каспазы 3/7 в течение 96 ч. ТМСВ132 способствовал дозозависимому снижению жизнеспособных клеток LNCaP с увеличением времени. Дозозависимое увеличение активности каспазы 3/7 или сигнала флуоресценции указывает на гибель клеток LNCaP в присутствии Т-клеток (фиг. 74). Данные демонстрируют, что ТМСВ132 эффективен для индукции опосредованной Т-клетками гибели опухолевых клеток LNCaP.

Эффективность ТМСВ132 в развившемся п/к ксенотрансплантате человеческих клеток предстательной железы у гуманизированных Т-клетками мышей.

Противоопухолевую эффективность ТМСВ132 оценивали в развившихся подкожных (п/к) ксенотрансплантатах человеческих клеток LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1wj1</sup>/SzJ (NSG, The Jackson Laboratory, Бар Харбор, штат Мериленд), гуманизированных 20е6 Т-клетками. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. ТМСВ132 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело null×CD3В219 в

дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 4 недель. На 45 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере семь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для ТМСВ132 в дозах

0,5 и 0,1 и 0,05 мг/кг по сравнению с контролем null×CD3 (фиг. 75,  $p \leq 0,0001$ ). ТМСВ132 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывал ингибирование роста опухоли на 102, 109 и 47% соответственно, по сравнению с контрольными образцами, получавшими Null×CD3. Лечение ТМСВ132 привело к получению трех, двух и одного полного ответа при дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг соответственно.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

а) тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

б) варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661;

с) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 676;

д) варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или

е) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 677.

2. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

3. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, в котором аффинность связывания составляет около 100 нМ или менее.

4. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2 или 3, в котором аффинность связывания измеряют с помощью проточной цитометрии или анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C.

5. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих пунктов, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три или четыре из следующих свойств:

а) связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 300 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 300 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

б) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3e от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) 300 нМ или менее, в котором  $K_D$  измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C; или

с) связывает остатки 1-6 CD3e (SEQ ID NO: 636) при определении с помощью рентгеновской кристаллографии.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих пунктов, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене антитела, причем по меньшей мере одна замена включает

а) замены в тяжелой цепи K409R, F405L или F405L и R409K;

б) замены в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A;

с) замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S, при этом антитело относится к изотипу IgG1; или

д) замену в тяжелой цепи S228P, при этом антитело относится к изотипу IgG4,

в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов,

содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее последовательность тяжелой цепи (HC) и последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

12. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

13. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно.

14. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

15. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

16. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

17. Антитело или его антигенсвязывающий участок по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является человеческим или гуманизированным.

18. Антитело по п.17, в котором антитело относится к изотипу IgG4 или IgG1.

19. Антитело по п.18, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

20. Антитело анти-CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC с SEQ ID NO: 640 и LC с SEQ ID NO: 646, содержащее по меньшей мере одну замену, включающую

а) замены в легкой цепи D43G, L49M, L50I, S62N, Q85E;

б) замены в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E, H89Y;

в) замены в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R70K, T83S, L96V;

д) любую одну из замен в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E или H89Y; или

е) любую одну из замен в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R79K, T83S или L96V,

в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

21. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является биспецифическим или мультиспецифическим.

22. Биспецифическое антитело анти-CD3, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690 соответственно.

23. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, при этом первый или второй домен содержит замены в тяжелой цепи S228P, F234A, L235A, F405L и R409K, а другой домен из первого или второго домена содержит замену в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

24. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый и/или второй домен содержит по меньшей мере одну замену в константном домене CH3, содержащем замену F405L или F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

25. Биспецифическое антитело по п.22, в котором один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи F405L, а другой из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

26. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, при этом один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи S228P, а другой из первого или второго доменов содержит замены в тяжелой цепи S228P, F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

27. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661 соответственно.

28. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676 соответственно.

29. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678 соответственно.

30. Биспецифическое антитело по п.22, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677 соответственно.

31. Биспецифическое антитело по п.22, в котором второй антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной

эффекторной клетки.

32. Биспецифическое антитело по п.31, в котором антиген клеточной поверхности представляет собой ассоциированный с опухолью антиген.

33. Биспецифическое антитело по любому из пп.24-32, в котором второй антиген представляет собой CD33, IL1RAP, PSMA или TMEFF2.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по любому из пп.1-11, антитело по любому из пп.12-21 или биспецифическое антитело по любому из пп.22-33 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Полинуклеотид, кодирующий выделенное антитело по любому из пп.1-11, антитело по любому из пп.12-21, биспецифическое антитело по любому из пп.22-33.

36. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.35.

37. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.36.

38. Способ получения выделенного антитела по любому из пп.1-11, антитела по любому из пп.12-21, биспецифического антитела по любому из пп.22-33, включающий культивирование клетки-хозяина по п.37 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

39. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-11, антитела по любому из пп.12-21, биспецифического антитела по любому из пп.22-33 для лечения злокачественного новообразования, где злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

40. Применение по п.39, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

41. Применение по п.40, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы или злокачественную опухоль предстательной железы.

42. Применение по п.39, в котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритических клеток (ОБПДК).

43. Применение по любому из пп.39-42, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

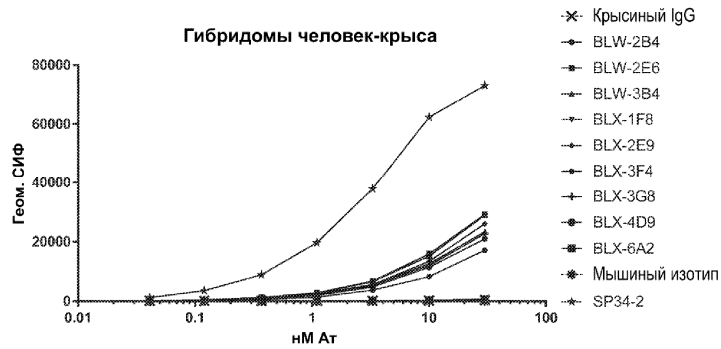
44. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-11, антитела по любому из пп.12-21, биспецифического антитела по любому из пп.22-33 в терапии рака.

VH		1	50
BLW-2B4-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLW-3B4-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLX-1F8-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLX-3G8-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLX-3F4-гамма	(1)	QVRLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLW-2E6-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
BLX-2E9-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
IGHV6-1*01_Homo	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFN
			SSNSAANNWIRQSPSRGLEWL
			CDR1
		51	100
BLW-2B4-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLW-3B4-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLX-1F8-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLX-3G8-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLX-3F4-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLW-2E6-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
BLX-2E9-гамма	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
IGHV6-1*01_Homo	(51)	GRTYYRSKWL	YDYAVSVKSRITVNP
			STLNQFSLQLNSVTPEDTALYYCA
			CDR2
		101	120
BLW-2B4-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLW-3B4-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLX-1F8-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLX-3G8-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLX-3F4-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLW-2E6-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
BLX-2E9-гамма	(101)	RGYSSSF	YWGQGLTVTVSS
IGHV6-1*01_Homo	(101)	R-----	-----
			CDR3

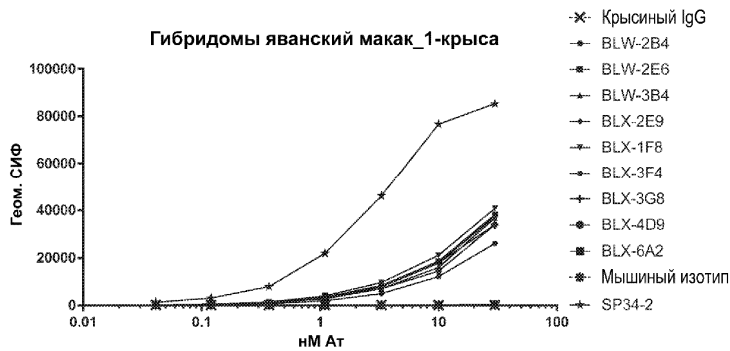
Фиг. 1А

VL	1	50
BLW-2B4-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSRDIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLW-3B4-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSRDIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLX-1F8-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSD <del>I</del> GYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLW-2E6-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSNIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLX-2E9-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSNIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLX-3F4-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSNIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
BLX-3G8-лямбда	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSNIGTYK <del>F</del> VS <del>W</del> YQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> VLL
IGLV2-23*02_Homo	(1)	QSAL <del>T</del> QPASVSGSPGGQSIITISCTGTSSD <del>V</del> GSY <del>N</del> LV <del>S</del> WYQ <del>H</del> PD <del>K</del> AP <del>K</del> LM <del>I</del>
		CDR1
	51	100
BLW-2B4-лямбда	(51)	YEVNKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLW-3B4-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-1F8-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLW-2E6-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-2E9-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-3F4-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-3G8-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL
IGLV2-23*02_Homo	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAED <del>E</del> ADY <del>Y</del> CCSYAGSG <del>S</del> T <del>F</del> -
		CDR2 CDR3
	101	
BLW-2B4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLW-3B4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLX-1F8-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLW-2E6-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLX-2E9-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLX-3F4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
BLX-3G8-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL
IGLV2-23*02_Homo	(100)	-----

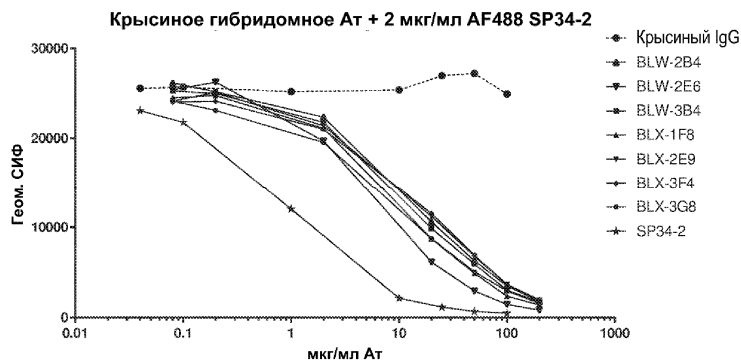
Фиг. 1B



Фиг. 2

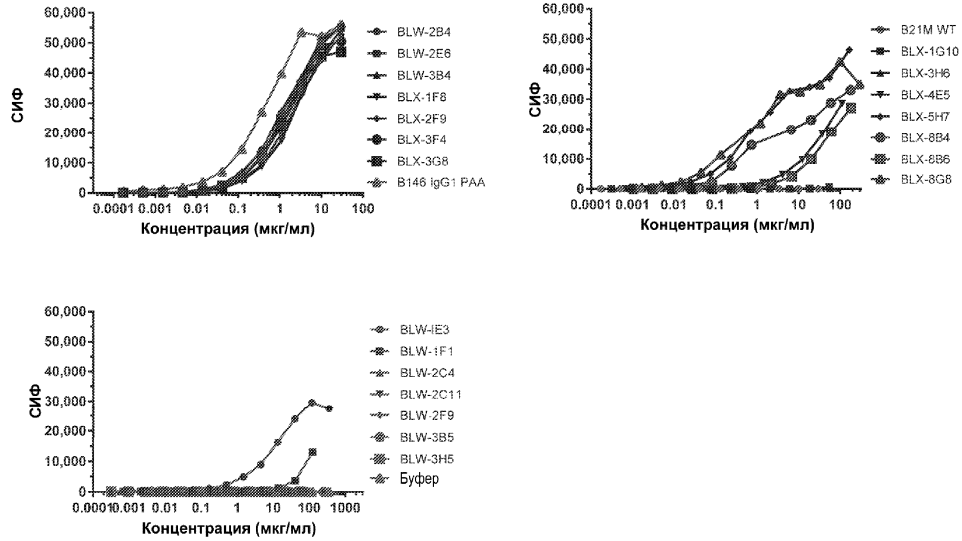


Фиг. 3

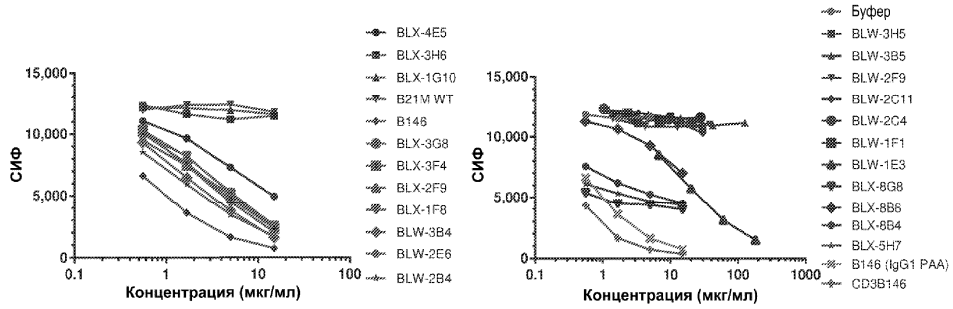


Фиг. 4

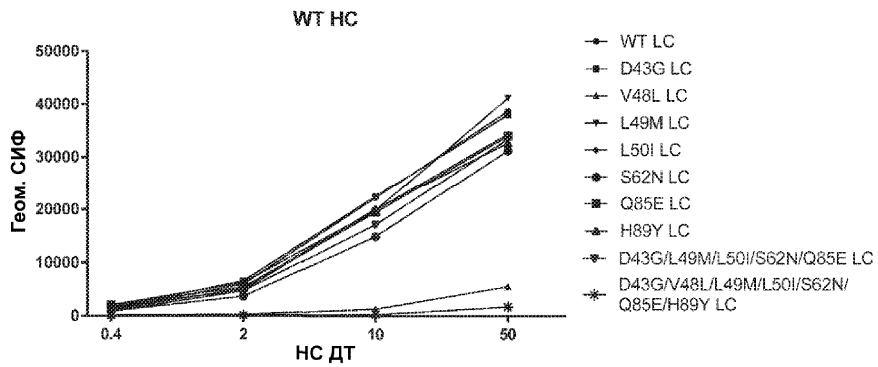




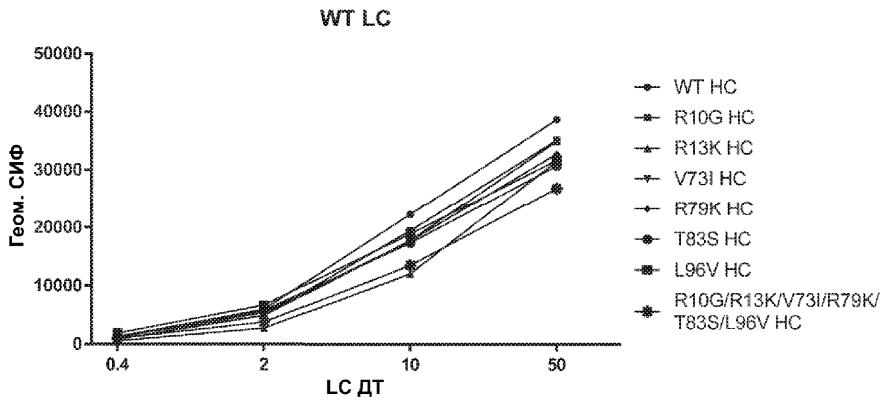
Фиг. 5



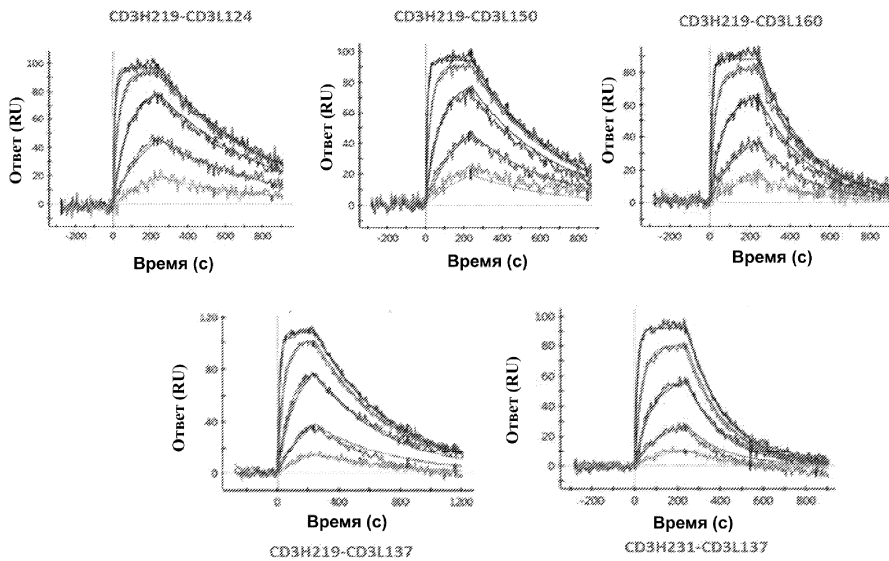
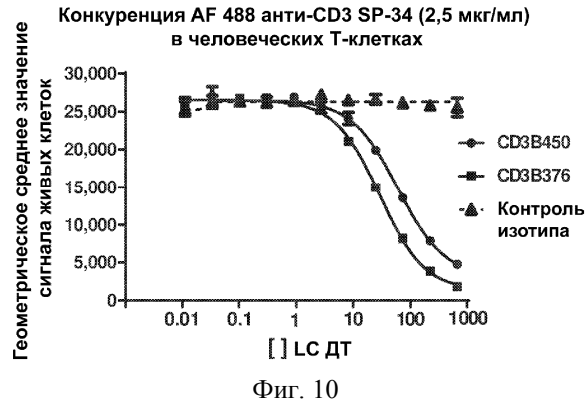
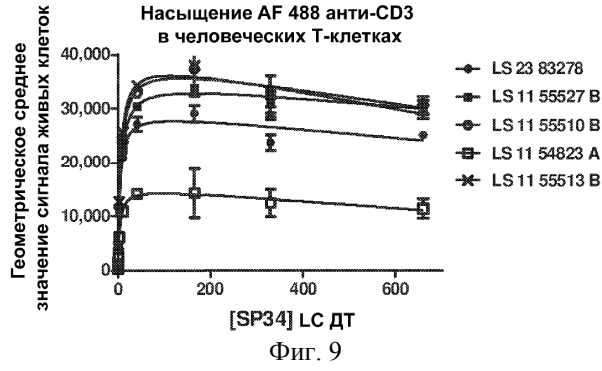
Фиг. 6



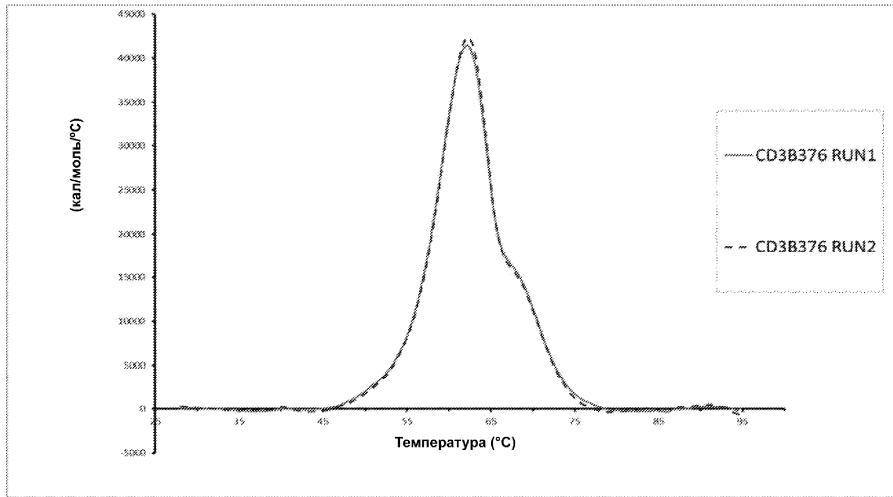
Фиг. 7



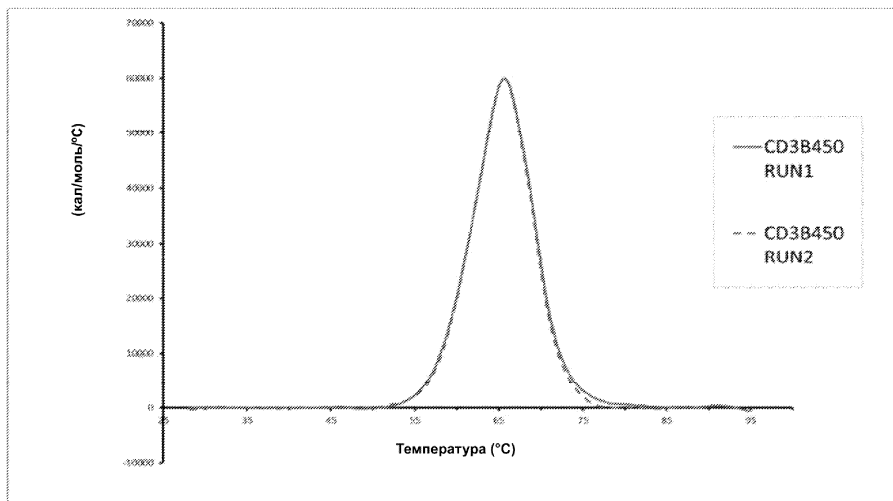
Фиг. 8



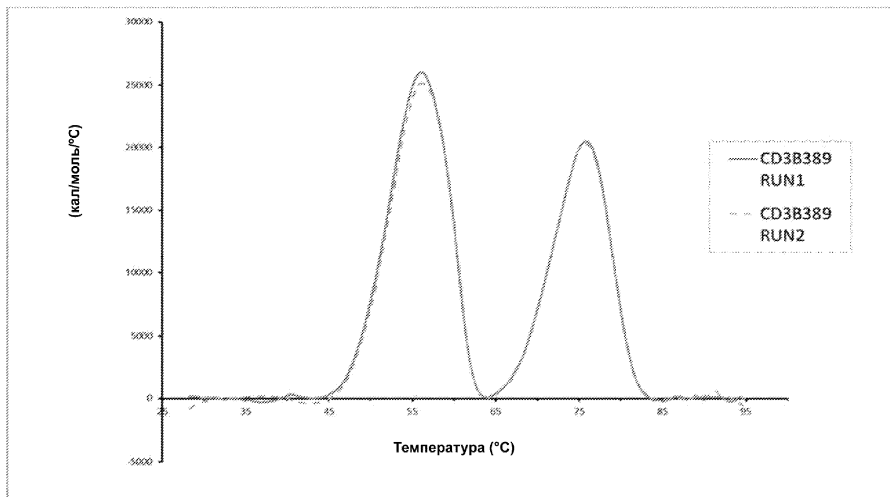
045935



Фиг. 12А

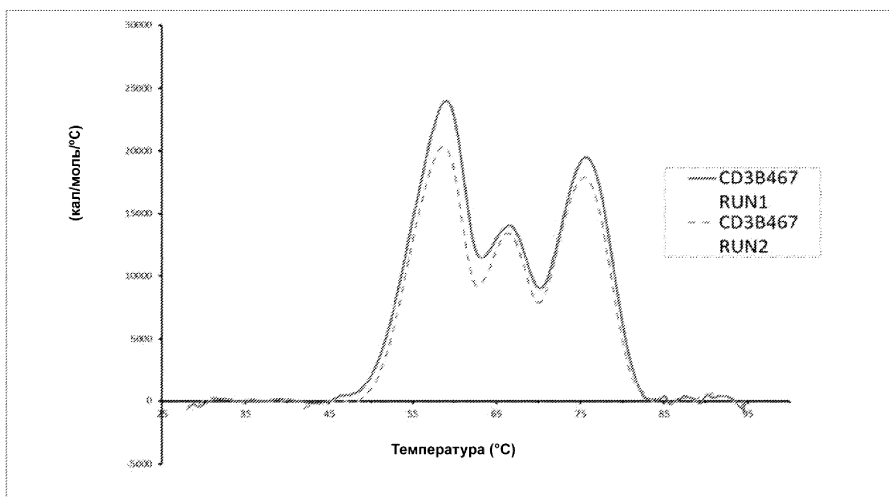


Фиг. 12В

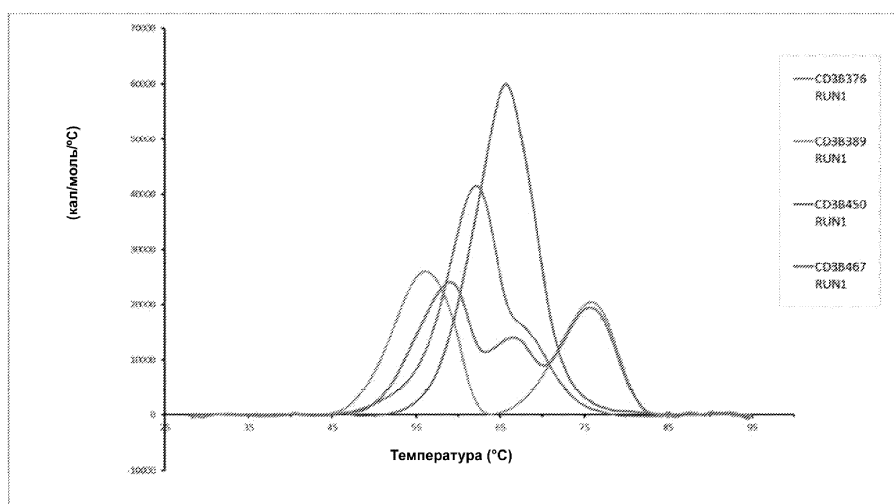


Фиг. 12С

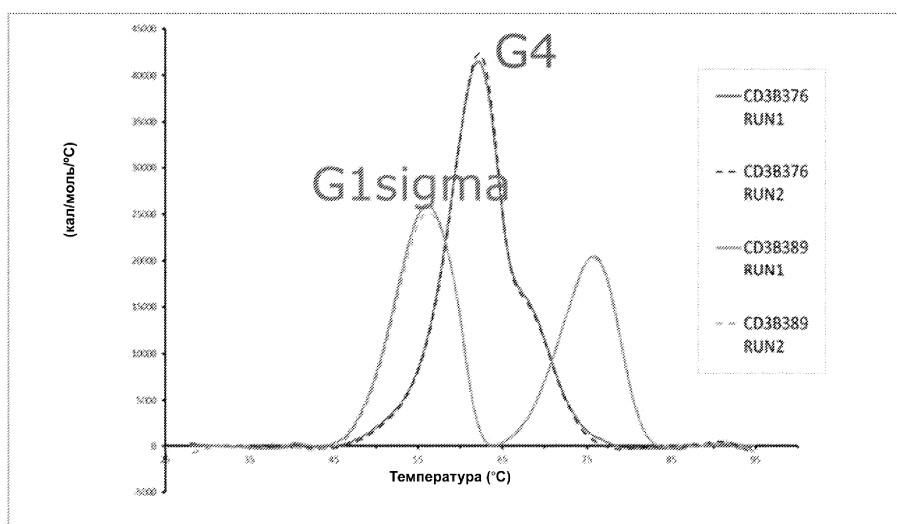
045935



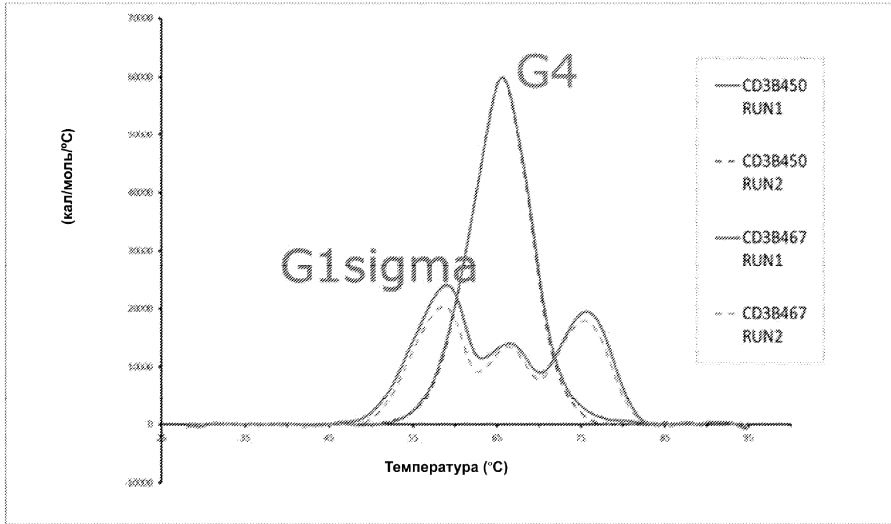
Фиг. 12D



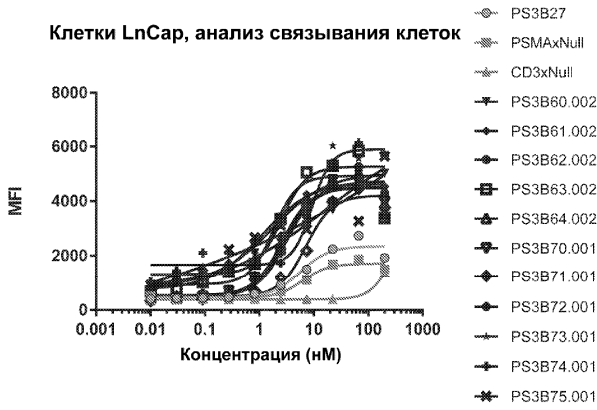
Фиг. 12E



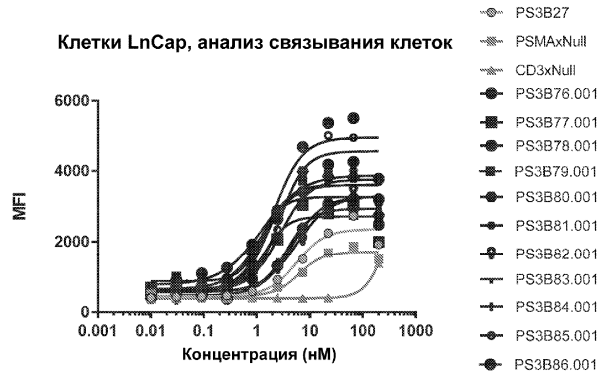
Фиг. 13A



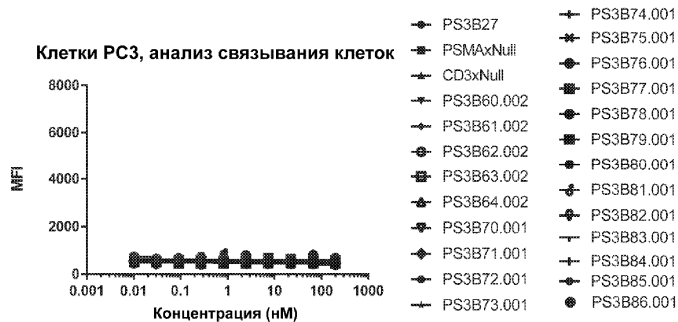
Фиг. 13В



Фиг. 14

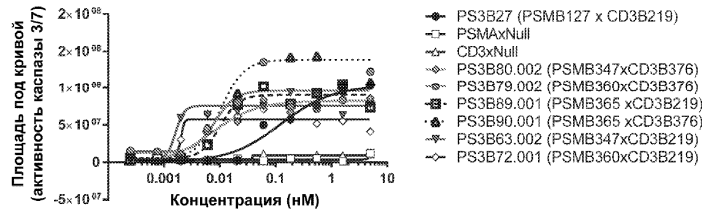


Фиг. 15

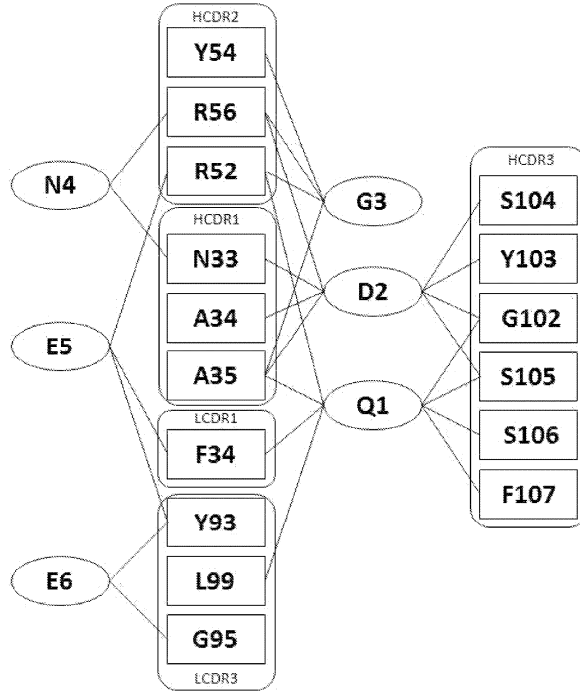


Фиг. 16

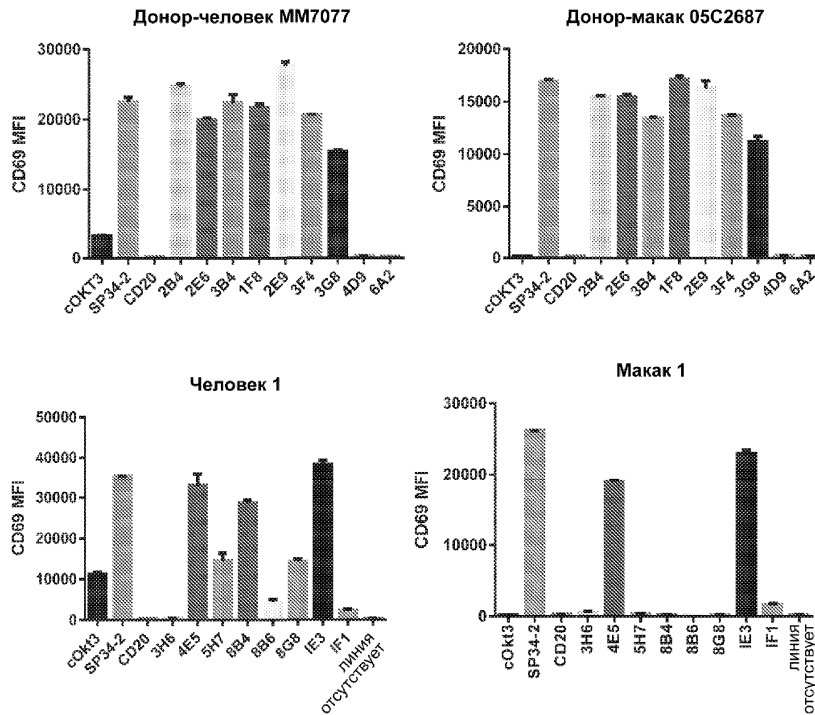
Кривая уничтожения клеток  
LpCar в течение 72 ч



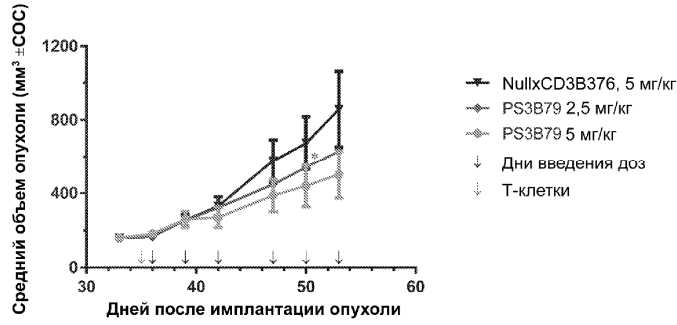
Фиг. 17



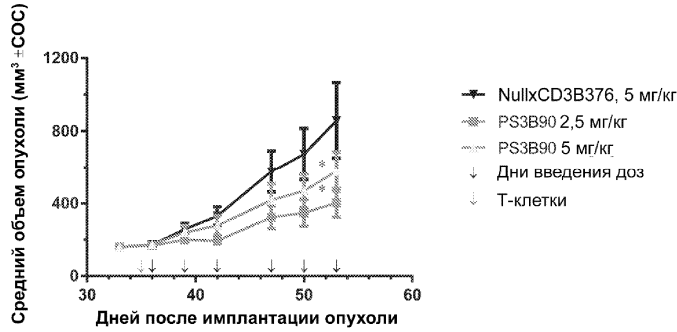
Фиг. 18



Фиг. 19

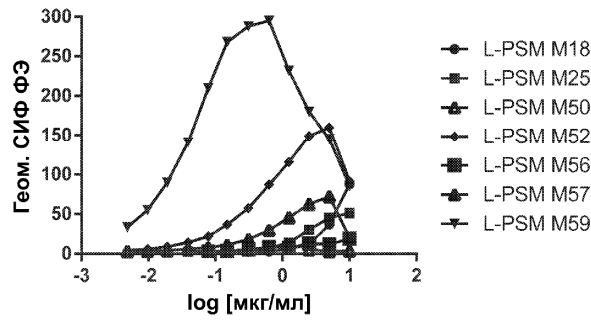


Фиг. 20



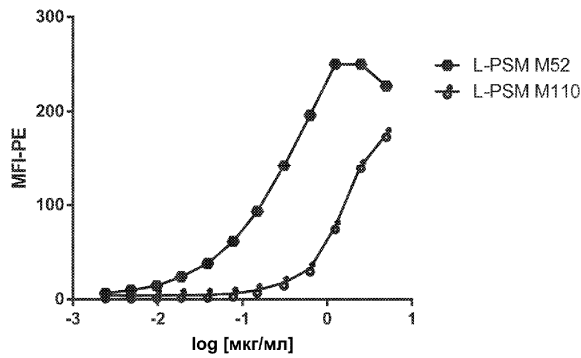
Фиг. 21

Связывание с LNCaP (человека)



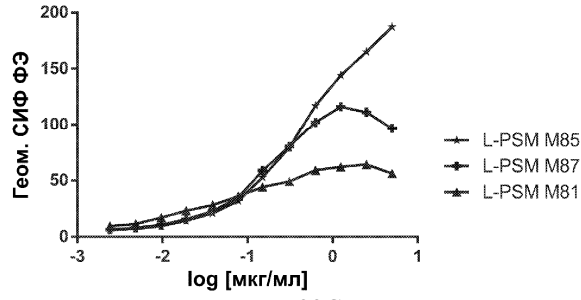
Фиг. 22А

Связывание с LNCaP (человека)



Фиг. 22В

Связывание с LNCaP (человека)



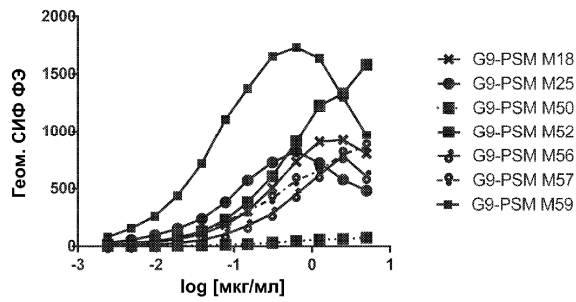
Фиг. 22С

Связывание с LNCaP (человека)



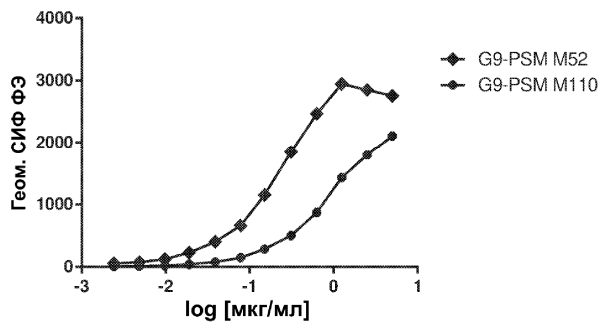
Фиг. 22D

Связывание с PSMG9 (шимпанзе)



Фиг. 23А

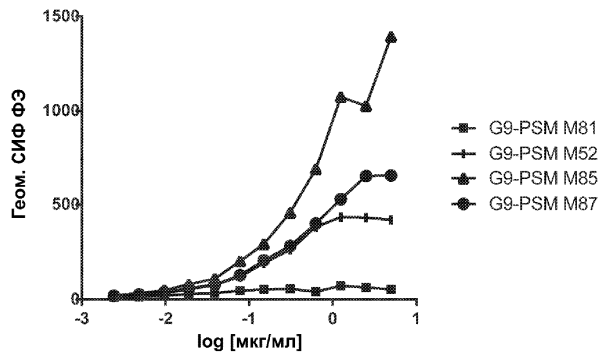
Связывание с PSMG9 (шимпанзе)



Фиг. 23В

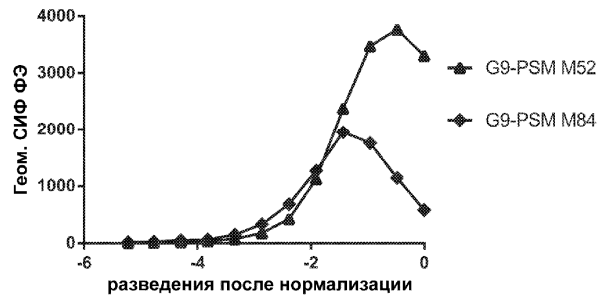


Связывание с PSMG9 (шимпанзе)



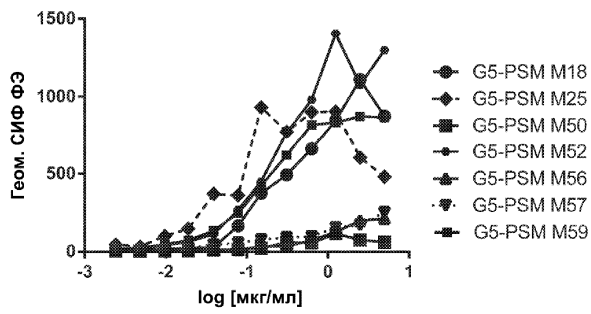
Фиг. 23С

Связывание с PSMG9 (шимпанзе)



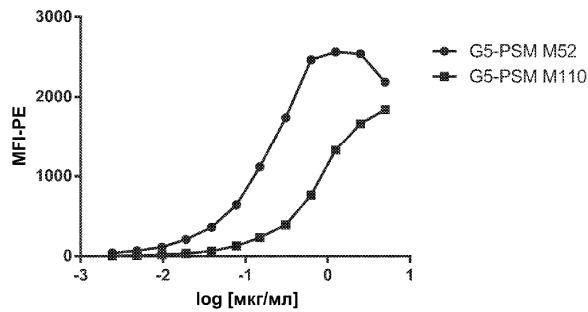
Фиг. 23В

Связывание с PSMG5 (яванского макака)



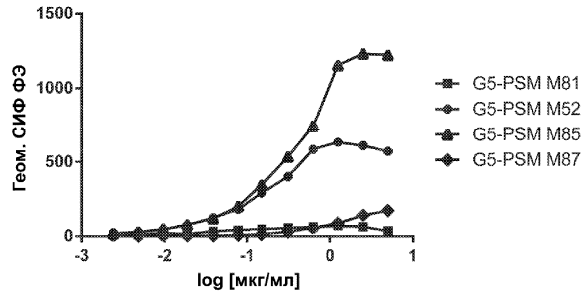
Фиг. 24А

Связывание с PSMG5 (яванского макака)



Фиг. 24В

**Связывание с PSMG5 (яванского макака)**



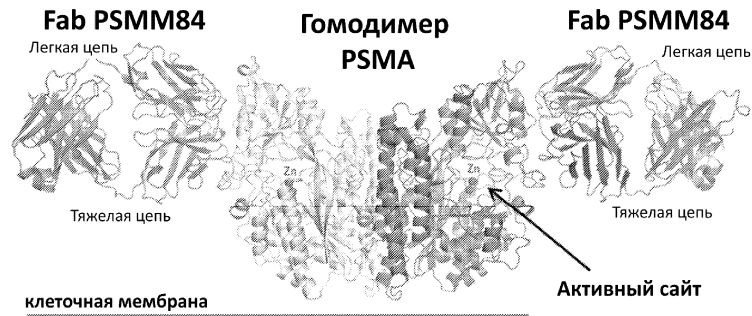
Фиг. 24С

**Связывание с PSMG5 (яванского макака)**

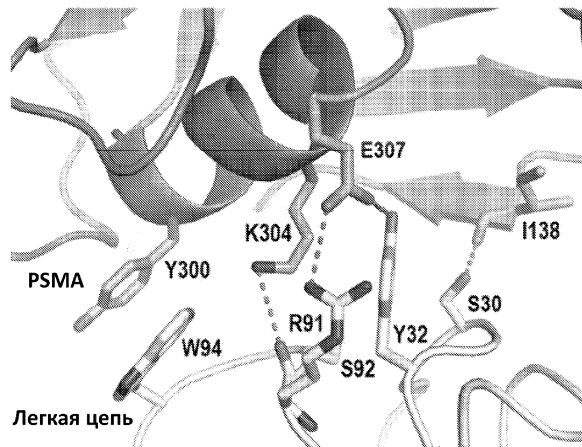


Фиг. 24D

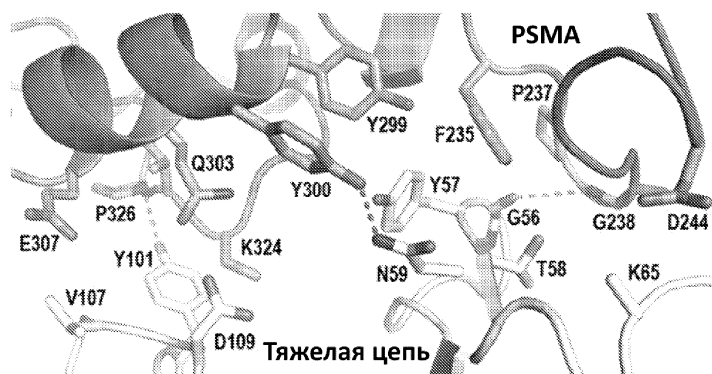
Общая структура Fab PSMM84, связанного с PSMA



Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27

## Остатки эпитопа PSMM84

PSMA человека	(1)	MMNLLHETDSAVATARRRPRLCAGALVLAG-GPFLGFLPGWFIKSSNEAT-NIIPKHNMKAFLDLKAENIKKFLXNFTQIPHLAGTQDNFQL
PSMA мыши	(1)	MMNALQDRDSAEVLGHRQRWLRVGLVLAITGTLFGFLPGWFIKPSNEATGNVSHSGMKKEFLHDLKAENIKKFLXNFTQIPHLAGTQDNFQL
PSMA яванского макака	(1)	MMNLLHETDSAVATARRRPRLCAGALVLAG-GPFLGFLPGWFIKSSSRAT-NIIPKHNMKAFLDLKAENIKKFLXNFTQIPHLAGTQDNFQL
PSMA человека	(93)	AKQIQSQWKEFGLDLVELSHYDVLISYPNKHHPNYISIIINEDGNEIPKISLSBQPPPCYENISDVVPPYSAPSPQGTPEGLLVVNYARTEDEF
PSMA мыши	(95)	AKQIQSQWKEFGLDLVELSHYDVLISYPNKHHPNYISIIINEDGNEIPKISLSBQPPPCYENISDVVPPYSAPSPQGTPEGLLVVNYARTEDEF
PSMA яванского макака	(93)	AKQIQSQWKEFGLDLVELSHYDVLISYPNKHHPNYISIIINEDGNEIPKISLSBQPPPCYENISDVVPPYSAPSPQGTPEGLLVVNYARTEDEF
PSMA человека	(187)	KLERDMKINCSGRIVIARYKVFVRGNVKNQAQLAGAKGVIYSDPADYFAFGVKSYPDGNLPGGGVQRGNLNLNGAGDPLTPGYPANEXAYR
PSMA мыши	(189)	KLEREMKINCSGRIVIARYKVFVRGNVKNQAQLAGAKGMILYSDPADYFAFGVKSYPDGNLPGGGVQRGNLNLNGAGDPLTPGYPANEXAYR
PSMA яванского макака	(187)	KLERDMKINCSGRIVIARYKVFVRGNVKNQAQLAGATGVILYSDPADYFAFGVKSYPDGNLPGGGVQRGNLNLNGAGDPLTPGYPANEXAYR
PSMA человека	(281)	RGIAEAVGLFPIPVHPIGYDADQKLLKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYVNGVPGFTGNFSTQKVKMHHSITNEVIRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA мыши	(283)	HELTNAVGLFPIPVHPIGYDADQKLLKMGGPAPPDSSWKGGLKVPYVNGVPGFAGNFSTQKVKMHHSYTKVIRIYNVIGTLRGALEPDRYVIL
PSMA яванского макака	(281)	RGMAEAVGLFPIPVHPIGYDADQKLLKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYVNGVPGFTGNFSTQKVKMHHSITSEVIRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA человека	(375)	GGHRDSWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKEGWRRPRTILFASWDAEEFGLLGSSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA мыши	(377)	GGHRDAWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKGRRPRTILFASWDAEEFGLLGSSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA яванского макака	(375)	GGHRDSWVFGGIDPQSGAAVHVEIVRSFGTLKKEGWRRPRTILFASWDAEEFGLLGSSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA человека	(469)	LMYSLVHNLTKELKSPDEGFEKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEINKFSGYFLYHSVETIYELV
PSMA мыши	(471)	LMYSLVYNLTKEKSPDEGFEKSLYDSWKEKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWKINRVSISYFLYHSVETIYELV
PSMA яванского макака	(469)	LMYSLVYNLTKEKSPDEGFEKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWEINKFSGYFLYHSVETIYELV
PSMA человека	(563)	EKEYDPMFKYHLITVAQVRGAMVPELANSIYVLPDCRDIYAVLRKYADKIYISIMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNTEIASKFSERLQEDPKS
PSMA мыши	(565)	VKEYDPMFKYHLITVAQVRGAMVPELANSIYVLPDCQSIYAVLRKYADKIYINISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNTEIVASRNLQEDPKS
PSMA яванского макака	(563)	EKEYDPMFKYHLITVAQVRGAMVPELANSIYVLPDCRDIYAVLRKYADKIYINISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNTEIASKFSERLQEDPKS
PSMA человека	(657)	NPILRLRIMNDQMLPDERAFIDPLGLPDRPPYRHYIYAPSSHNKYAGESFPGLYDALFDIESKVDPSKAWCEVVKRQIYAAFTVQAAEATLSEVA
PSMA мыши	(659)	NPILRLRIMNDQMLPDERAFIDPLGLPDRPPYRHYIYAPSSHNKYAGESFPGLYDALFDISGVNASKAWCEVVKRQIYAAFTVQAAEATLSEVA
PSMA яванского макака	(657)	NPILRLRIMNDQMLPDERAFIDPLGLPDRPPYRHYIYAPSSHNKYAGESFPGLYDALFDIESKVDPSKAWCEVVKRQIYAAFTVQAAEATLSEVA

Остатки эпитопа заштрихованы. Дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

Фиг. 28

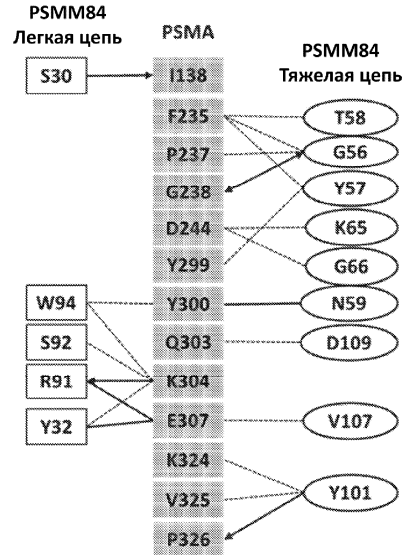
## Остатки паратопа PSMM84

## Паратоп PSMM84

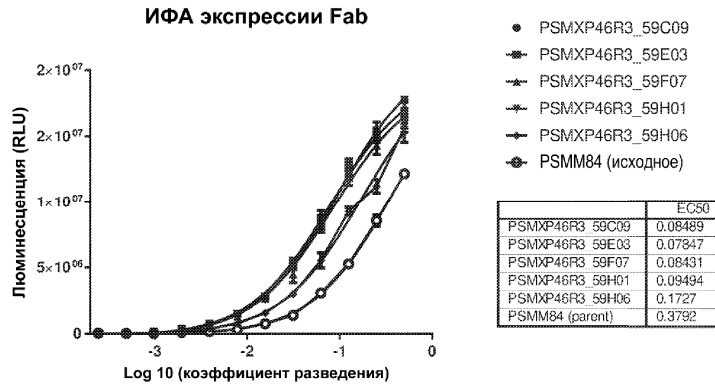
PSMM84_HC	(1)	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPCKGLEWVSEISGSGGTYNYADSVKGRFTISRDNK
PSMM84_HC	(77)	NFLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDSDYDSSLYVCDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCL
PSMM84_HC	(153)	VKDYFPEPVTYSWNSGALTSGVHFFAVLQSSGLYLSVSVVTVPESSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSC
PSMM84_LC	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT
PSMM84_LC	(73)	LTISLLEPEDFAVYYCQQRSNPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREA
PSMM84_LC	(145)	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKFSNRGEC

Области CDR подчеркнуты, остатки паратопа заштрихованы.

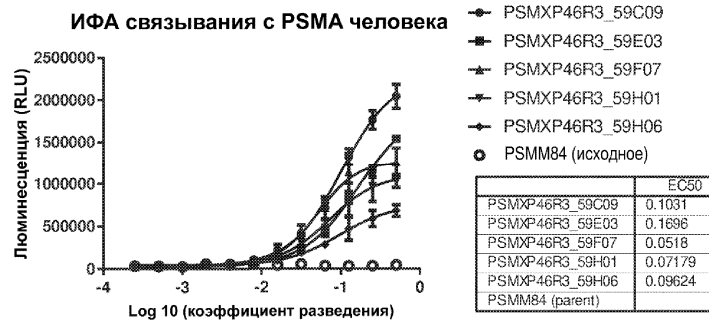
Фиг. 29



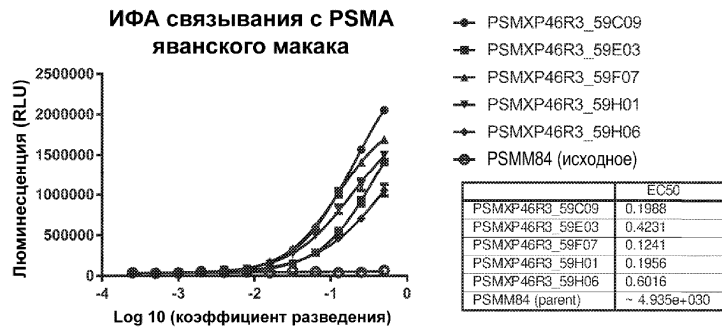
Фиг. 30



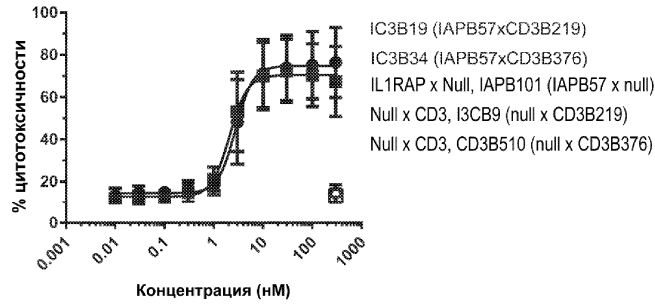
Фиг. 31



Фиг. 32

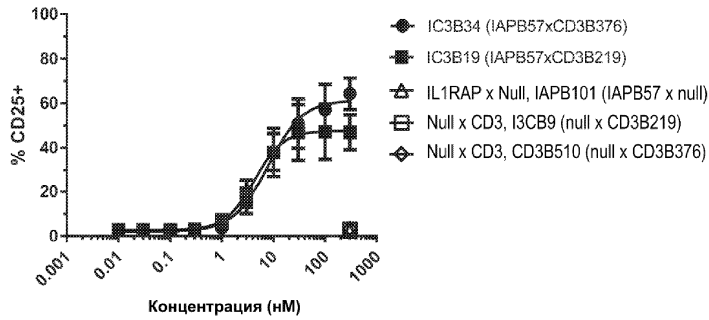


Фиг. 33



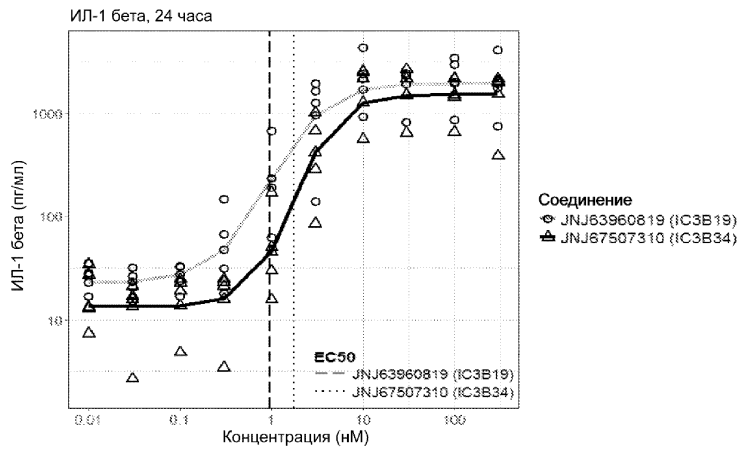
мкМ	0.0100	0.0300	0.1000	0.3000	1.0000	3.0000	10.0000	30.0000	100.0000	300.0000
мкг/мл	0.0015	0.0045	0.0150	0.0450	0.1500	0.4500	1.5000	4.5000	15.0000	45.0000

Фиг. 34



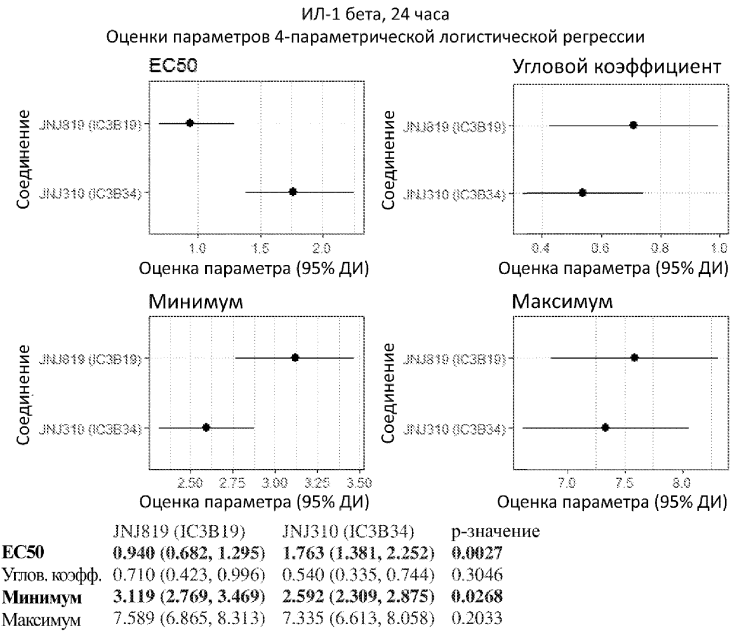
мкМ	0.0100	0.0300	0.1000	0.3000	1.0000	3.0000	10.0000	30.0000	100.0000	300.0000
мкг/мл	0.0015	0.0045	0.0150	0.0450	0.1500	0.4500	1.5000	4.5000	15.0000	45.0000

Фиг. 35

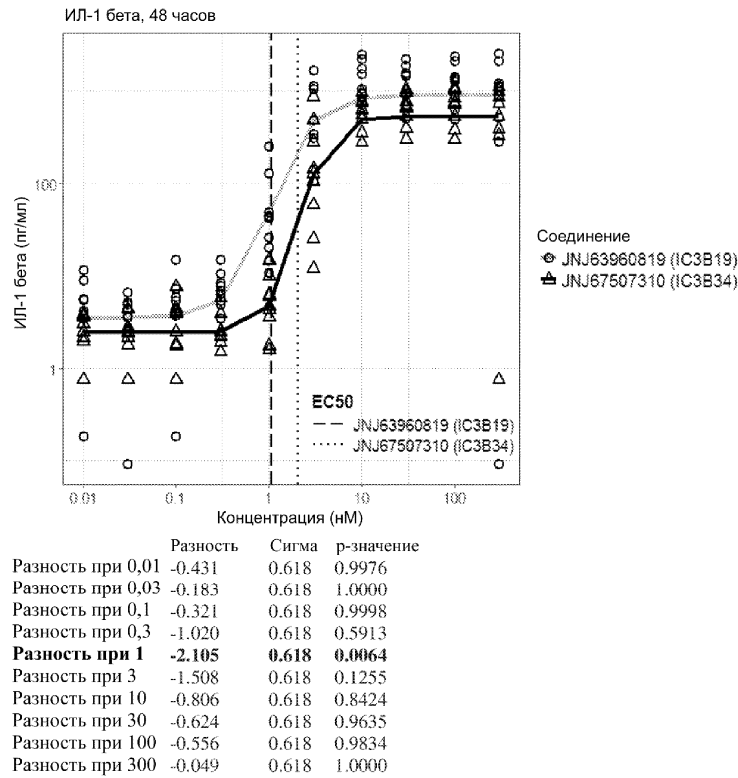


	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.414	0.553	0.9439
Разность при 0,03	-0.718	0.553	0.5723
Разность при 0,1	-0.537	0.553	0.8182
Разность при 0,3	-1.227	0.553	0.1172
<b>Разность при 1</b>	<b>-1.547</b>	<b>0.553</b>	<b>0.0281</b>
Разность при 3	-0.875	0.553	0.3817
Разность при 10	-0.248	0.553	0.9983
Разность при 30	-0.164	0.553	0.9999
Разность при 100	-0.348	0.553	0.9797
Разность при 300	-0.281	0.553	0.9955

Фиг. 36А

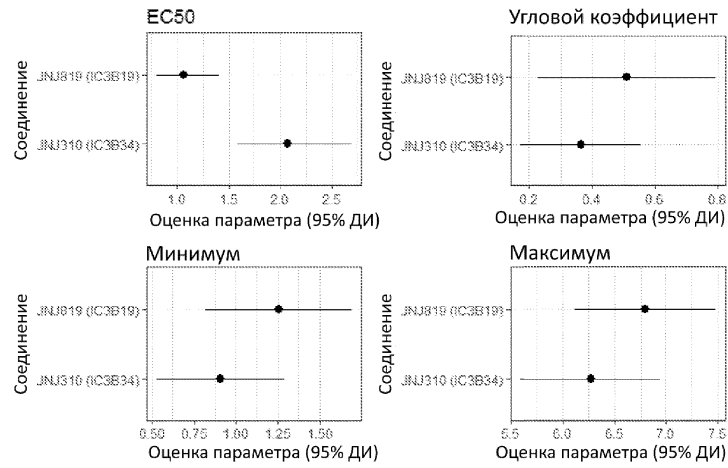


Фиг. 36В



Фиг. 37А

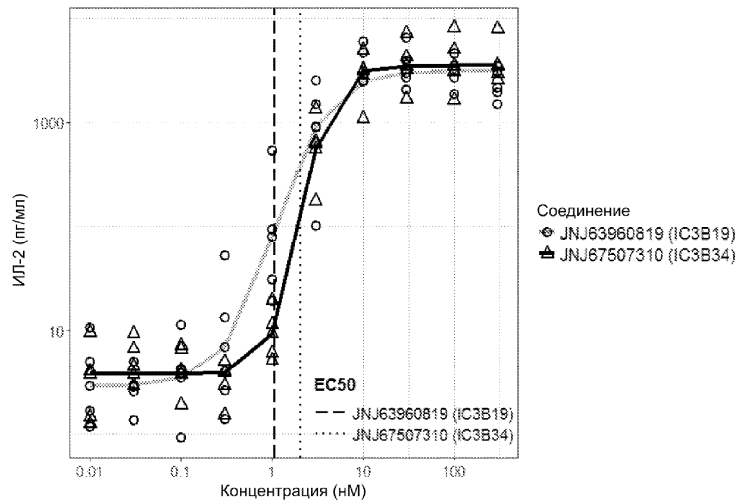
ИЛ-1 бета, 48 часов  
Оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
<b>EC50</b>	<b>1.060 (0.798, 1.408)</b>	<b>2.068 (1.587, 2.695)</b>	<b>0.0010</b>
Улов. коэфф.	0.512 (0.230, 0.794)	0.365 (0.173, 0.557)	0.3951
Минимум	1.254 (0.818, 1.690)	0.905 (0.525, 1.286)	0.2543
Максимум	6.798 (6.117, 7.478)	6.268 (5.589, 6.947)	0.0528

Фиг. 37В

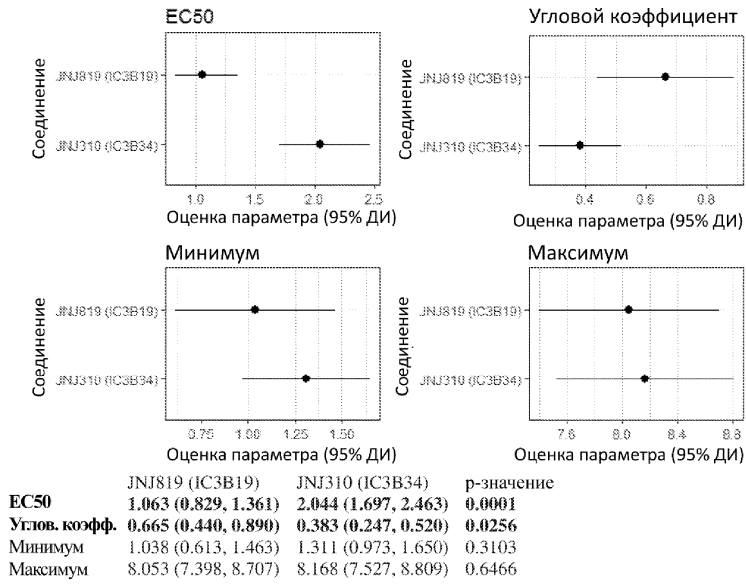
ИЛ-2, 24 часа



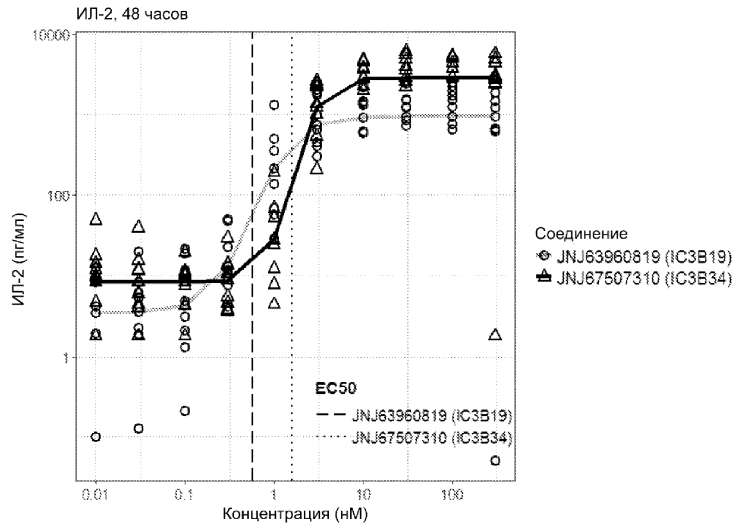
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.105	0.599	1.0000
Разность при 0,03	0.704	0.599	0.8315
Разность при 0,1	0.198	0.599	1.0000
Разность при 0,3	-0.841	0.599	0.6679
<b>Разность при 1</b>	<b>-2.095</b>	<b>0.599</b>	<b>0.0041</b>
Разность при 3	-0.330	0.599	0.9989
Разность при 10	-0.382	0.599	0.9963
Разность при 30	0.026	0.599	1.0000
Разность при 100	0.222	0.599	1.0000
Разность при 300	0.568	0.599	0.9440

Фиг. 38А

ИЛ-2, 24 часа  
Оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии



Фиг. 38В

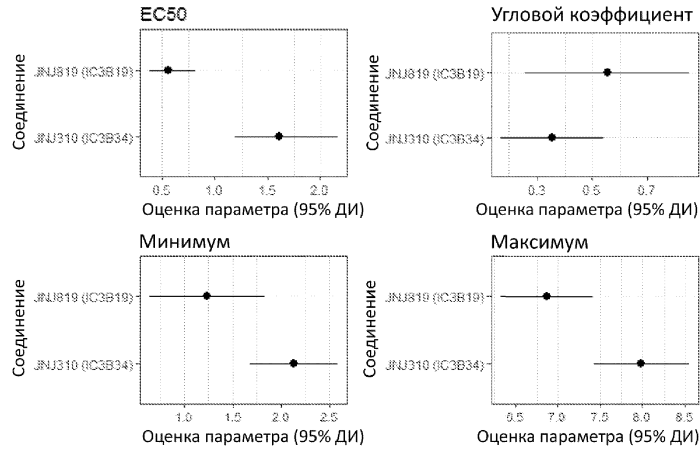


	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.928	0.676	0.8169
Разность при 0,03	0.859	0.676	0.8755
Разность при 0,1	0.737	0.676	0.9485
Разность при 0,3	-0.567	0.676	0.9917
<b>Разность при 1</b>	<b>-1.950</b>	<b>0.676</b>	<b>0.0370</b>
Разность при 3	0.372	0.676	0.9998
Разность при 10	0.954	0.676	0.7914
Разность при 30	0.987	0.676	0.7576
Разность при 100	1.066	0.676	0.6693
Разность при 300	1.488	0.676	0.2289

Фиг. 39А

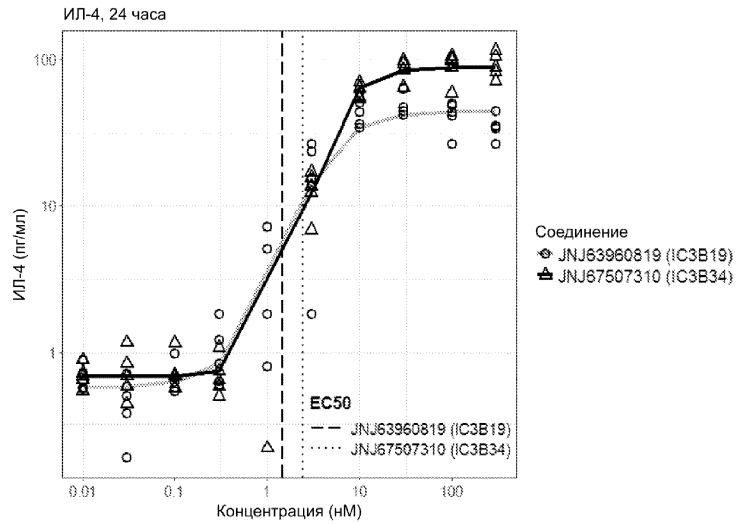


ИЛ-2, 48 часов  
Оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии



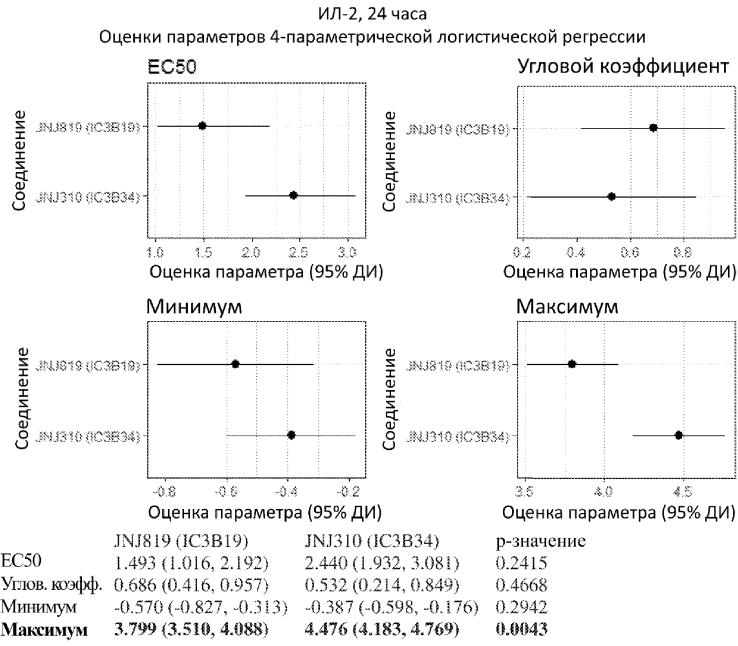
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
<b>EC50</b>	<b>0.558 (0.380, 0.821)</b>	<b>1.611 (1.199, 2.166)</b>	<b>знач.</b>
Углов. коэфф.	0.554 (0.256, 0.851)	0.353 (0.168, 0.539)	0.2079
<b>Минимум</b>	<b>1.231 (0.638, 1.824)</b>	<b>2.129 (1.674, 2.584)</b>	<b>0.0158</b>
<b>Максимум</b>	<b>6.874 (6.327, 7.421)</b>	<b>7.988 (7.425, 8.551)</b>	<b>0.0008</b>

Фиг. 39В

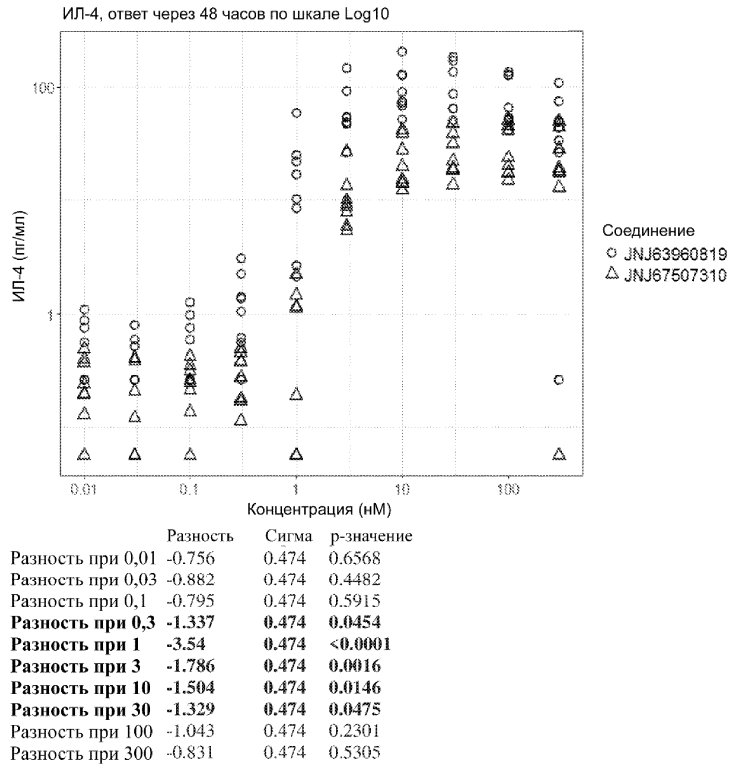


	Разность	Сигма	р-значение
Разность при 0,01	-0.010	0.301	1.0000
Разность при 0,03	0.563	0.301	0.3761
Разность при 0,1	0.110	0.301	1.0000
Разность при 0,3	-0.361	0.301	0.8592
Разность при 3	0.081	0.301	1.0000
Разность при 10	0.253	0.301	0.9815
Разность при 30	0.439	0.301	0.6850
Разность при 100	0.780	0.301	0.0749
<b>Разность при 300</b>	<b>1.031</b>	<b>0.301</b>	<b>0.0054</b>

Фиг. 40А

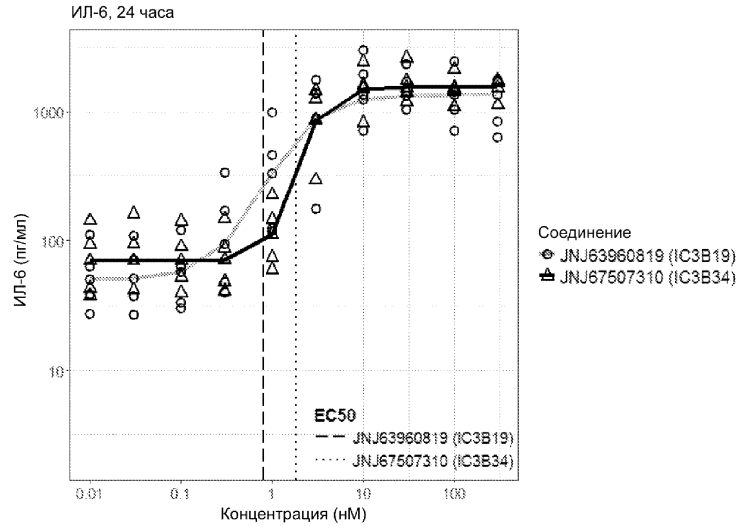


Фиг. 40В



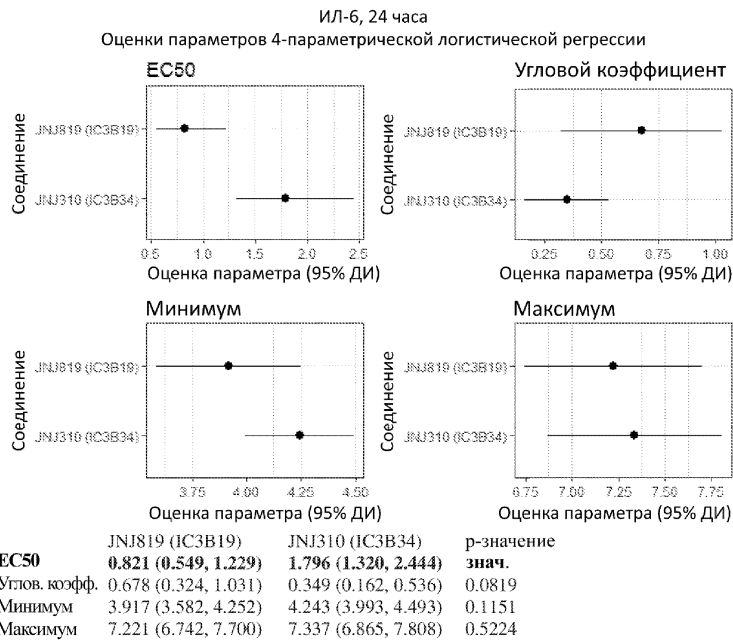
Фиг. 41

045935

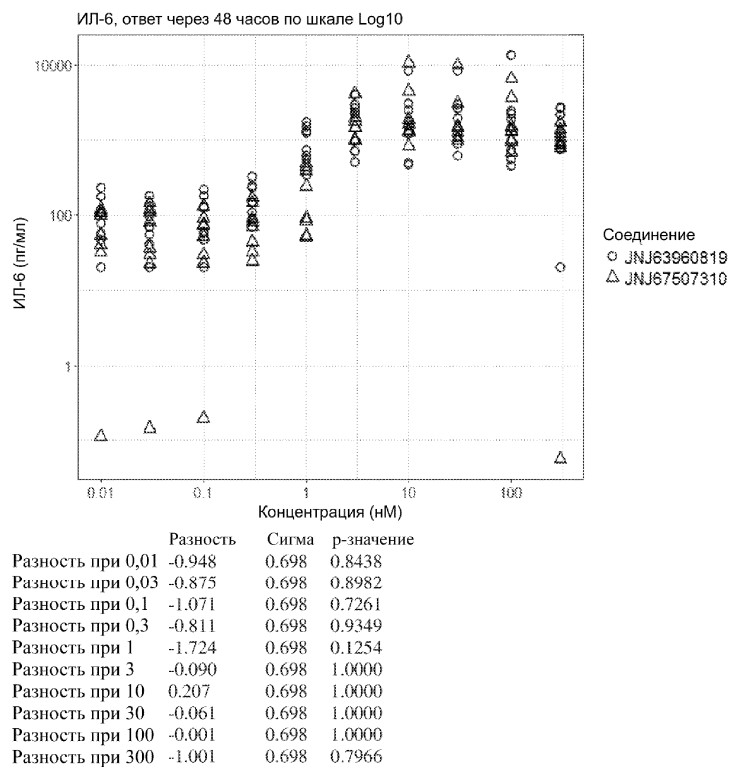


	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.263	0.456	0.9990
Разность при 0,03	0.302	0.456	0.9970
Разность при 0,1	0.304	0.456	0.9968
Разность при 0,3	-0.367	0.456	0.9866
Разность при 1	-0.962	0.456	0.2340
Разность при 3	-0.059	0.456	1.0000
Разность при 10	-0.037	0.456	1.0000
Разность при 30	0.056	0.456	1.0000
Разность при 100	0.156	0.456	1.0000
Разность при 300	0.314	0.456	0.9958

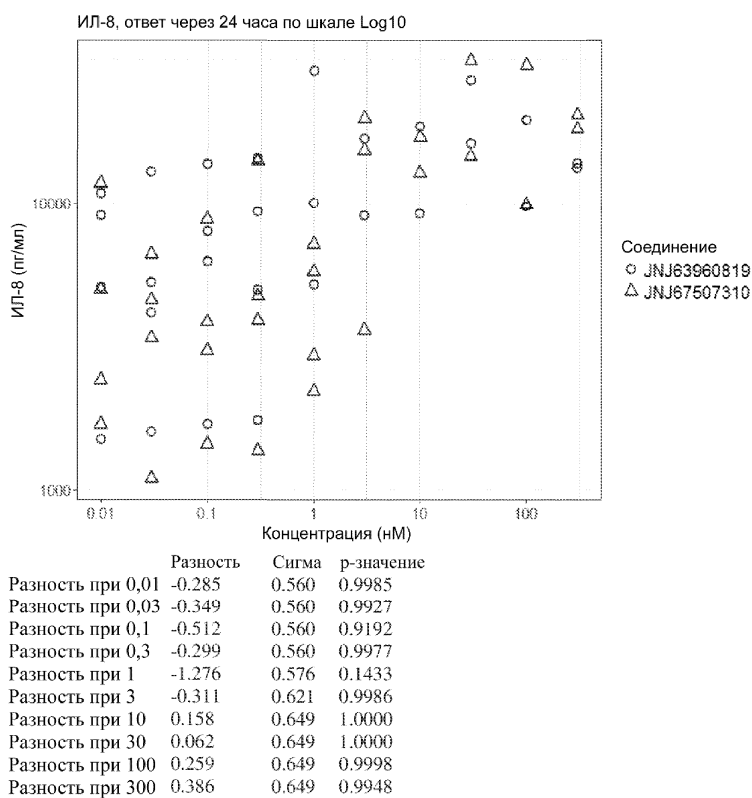
Фиг. 42А



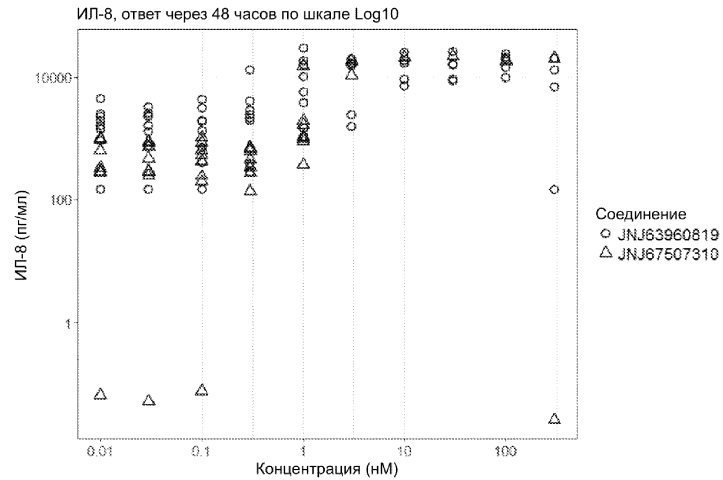
Фиг. 42В



Фиг. 43

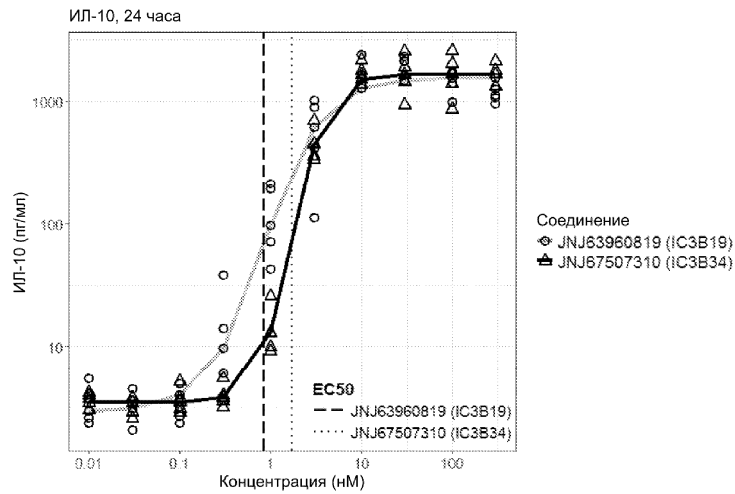


Фиг. 44



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-2.073	1.303	0.3365
Разность при 0,03	-2.198	1.303	0.2873
Разность при 0,1	-1.972	1.303	0.3811
Разность при 0,3	-2.753	1.309	0.1302
Разность при 1	-2.650	1.309	0.1533
Разность при 3	-0.834	1.419	0.9715
Разность при 10	-0.880	1.551	0.9766
Разность при 30	-0.819	1.551	0.9847
Разность при 100	-1.189	1.551	0.8961
Разность при 300	-1.909	1.445	0.5029

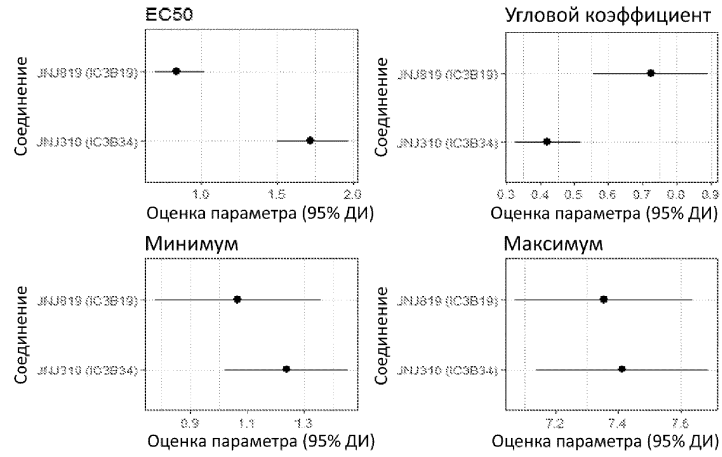
Фиг. 45



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.098	0.325	1.0000
Разность при 0,03	-0.077	0.325	1.0000
Разность при 0,1	0.127	0.325	1.0000
<b>Разность при 0,3</b>	<b>-0.963</b>	<b>0.325</b>	<b>0.0293</b>
<b>Разность при 1</b>	<b>-2.09</b>	<b>0.325</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Разность при 3	-0.026	0.325	1.0000
Разность при 10	-0.037	0.325	1.0000
Разность при 30	-0.245	0.325	0.9967
Разность при 100	0.098	0.325	1.0000
Разность при 300	0.375	0.325	0.9308

Фиг. 46А

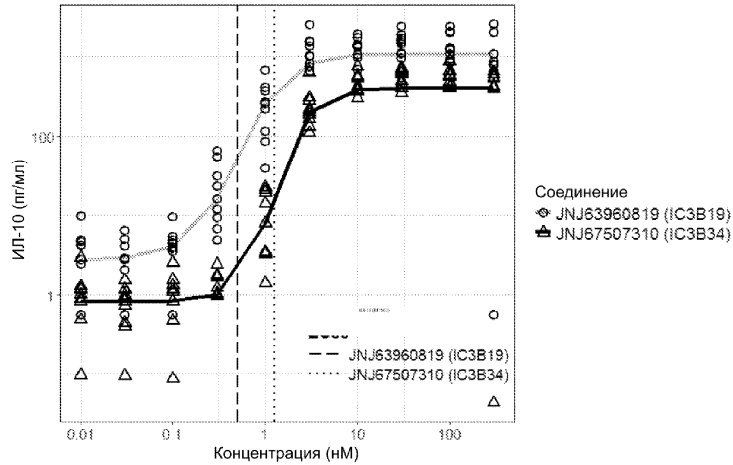
ИЛ-10, 24 часа



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
<b>EC50</b>	<b>0.844 (0.698, 1.021)</b>	<b>1.718 (1.500, 1.968)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Углов. коэфф.</b>	<b>0.724 (0.557, 0.892)</b>	<b>0.421 (0.325, 0.517)</b>	<b>0.0010</b>
Минимум	1.067 (0.775, 1.359)	1.237 (1.020, 1.453)	0.3406
Максимум	7.353 (7.070, 7.636)	7.413 (7.140, 7.686)	0.7036

Фиг. 46В

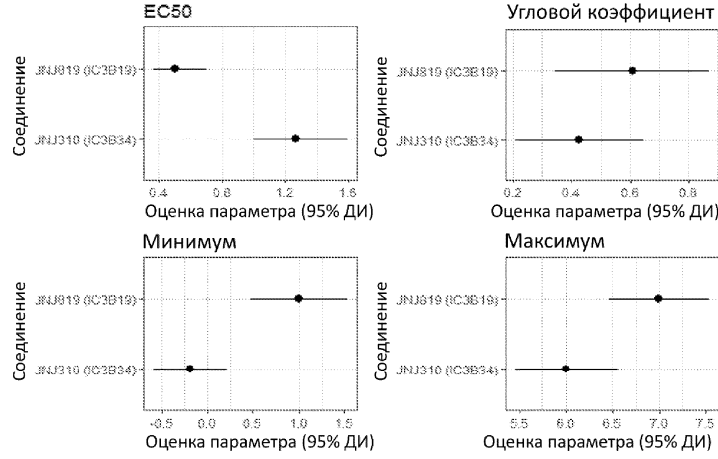
ИЛ-10, 48 часов



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-1.404	0.583	0.1405
Разность при 0,03	-1.391	0.583	0.1484
Разность при 0,1	-1.472	0.583	0.1043
<b>Разность при 0,3</b>	<b>-2.546</b>	<b>0.583</b>	<b>1e-04</b>
<b>Разность при 1</b>	<b>-3.33</b>	<b>0.583</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Разность при 3</b>	<b>-1.693</b>	<b>0.583</b>	<b>0.0352</b>
Разность при 10	-0.98	0.583	0.5852
Разность при 30	-1.011	0.583	0.5434
Разность при 100	-0.898	0.583	0.6952
Разность при 300	-0.956	0.583	0.6178

Фиг. 47А

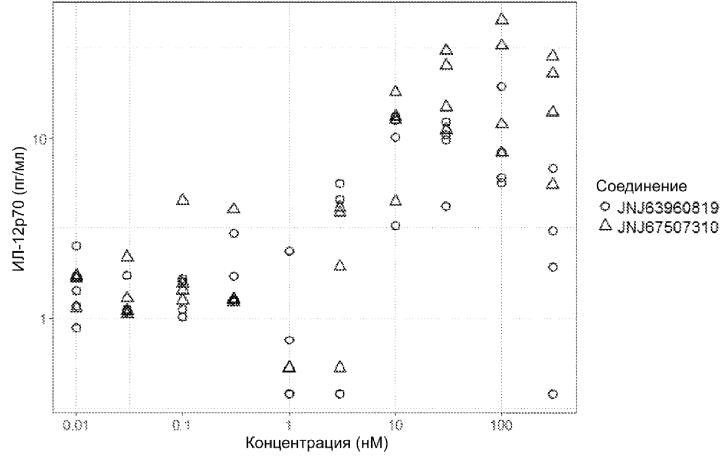
ИЛ-10, 48 часов



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
<b>EC50</b>	<b>0.503 (0.362, 0.697)</b>	<b>1.263 (1.000, 1.595)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Углов. коэфф.</b>	<b>0.607 (0.344, 0.870)</b>	<b>0.425 (0.206, 0.644)</b>	<b>0.2702</b>
<b>Минимум</b>	<b>1.006 (0.471, 1.540)</b>	<b>-0.192 (-0.599, 0.214)</b>	<b>0.0011</b>
<b>Максимум</b>	<b>6.999 (6.459, 7.539)</b>	<b>6.004 (5.453, 6.554)</b>	<b>0.0004</b>

Фиг. 47В

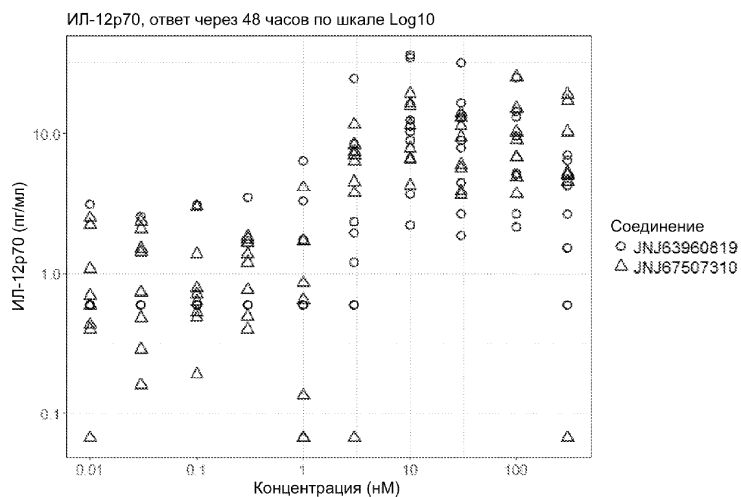
ИЛ-12p70, ответ через 24 часа по шкале Log10



	Разность	Сигма	р-значение
Разность при 0,01	0.096	0.485	1.0000
Разность при 0,03	0.081	0.485	1.0000
Разность при 0,1	0.351	0.485	0.9953
Разность при 0,3	0.002	0.485	1.0000
Разность при 1	-0.302	0.485	0.9986
Разность при 3	0.369	0.485	0.9931
Разность при 10	0.216	0.485	0.9999
Разность при 30	0.792	0.485	0.5672
Разность при 100	0.814	0.485	0.5321
<b>Разность при 300</b>	<b>2.024</b>	<b>0.485</b>	<b>0.0003</b>

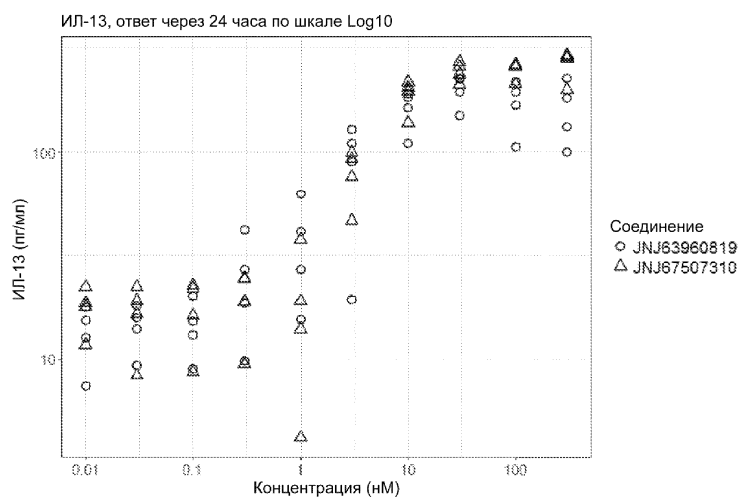
Фиг. 48

045935



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.140	0.503	1.0000
Разность при 0,03	0.108	0.503	1.0000
Разность при 0,1	-0.022	0.503	1.0000
Разность при 0,3	0.324	0.503	0.9988
Разность при 1	-0.822	0.503	0.6083
Разность при 3	0.623	0.503	0.8814
Разность при 10	-0.059	0.503	1.0000
Разность при 30	-0.022	0.503	1.0000
Разность при 100	0.178	0.503	1.0000
Разность при 300	0.718	0.503	0.7659

Фиг. 49

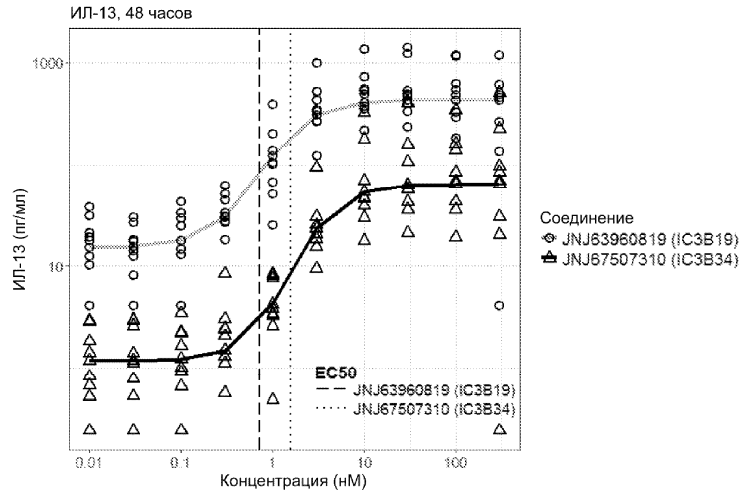


	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.307	0.312	0.8941
Разность при 0,03	0.108	0.312	1.0000
Разность при 0,1	0.161	0.312	0.9985
Разность при 0,3	-0.170	0.312	0.9978
Разность при 1	-0.817	0.312	0.0565
Разность при 3	0.071	0.312	1.0000
Разность при 10	0.159	0.312	0.9987
Разность при 30	0.212	0.312	0.9886
Разность при 100	0.393	0.312	0.7092
Разность при 300	0.536	0.312	0.3785

Фиг. 50

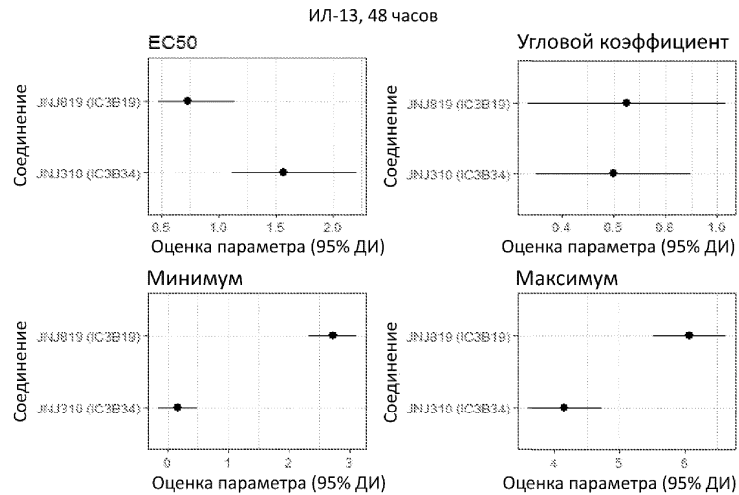


045935



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-2.735	0.49	<0.0001
Разность при 0,03	-2.489	0.49	<0.0001
Разность при 0,1	-2.726	0.49	<0.0001
Разность при 0,3	-2.846	0.49	<0.0001
Разность при 1	-3.337	0.49	<0.0001
Разность при 3	-2.707	0.49	<0.0001
Разность при 10	-2.132	0.49	1e-04
Разность при 30	-2.005	0.49	4e-04
Разность при 100	-1.869	0.49	0.0014
Разность при 300	-1.753	0.49	0.0034

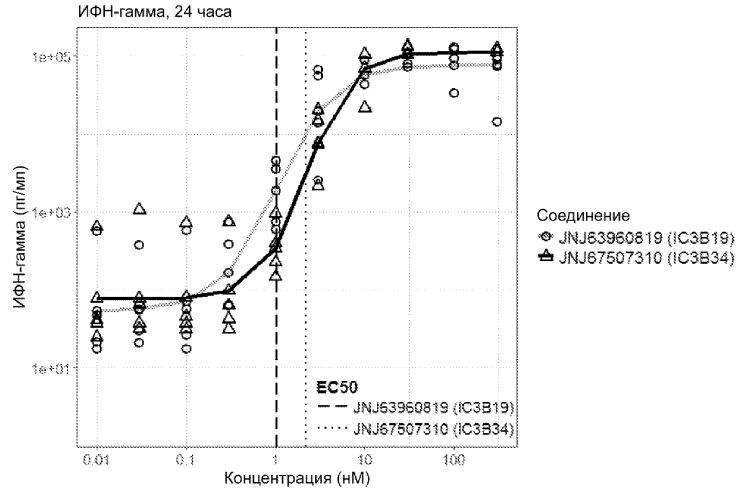
Фиг. 51А



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
<b>EC50</b>	<b>0.731 (0.467, 1.143)</b>	<b>1.564 (1.111, 2.202)</b>	<b>0.0106</b>
Углов. коэфф.	0.651 (0.270, 1.033)	0.599 (0.300, 0.899)	0.8268
<b>Минимум</b>	<b>2.729 (2.341, 3.118)</b>	<b>0.162 (-0.165, 0.490)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Максимум</b>	<b>6.077 (5.523, 6.630)</b>	<b>4.155 (3.590, 4.721)</b>	<b>&lt;0.0001</b>

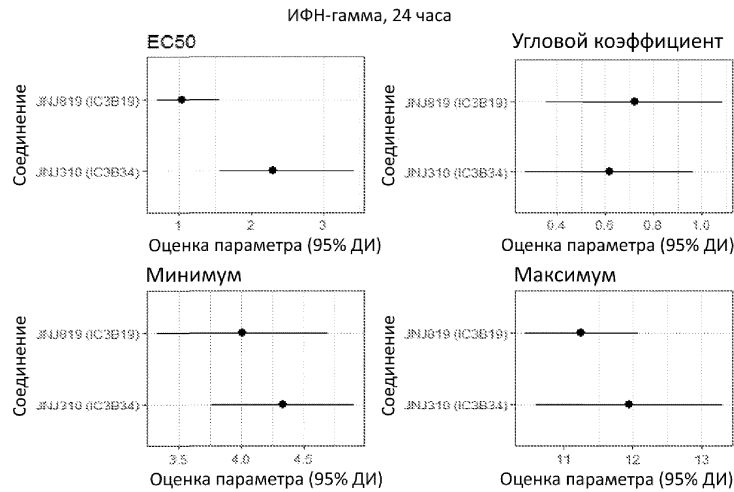
Фиг. 51В

045935



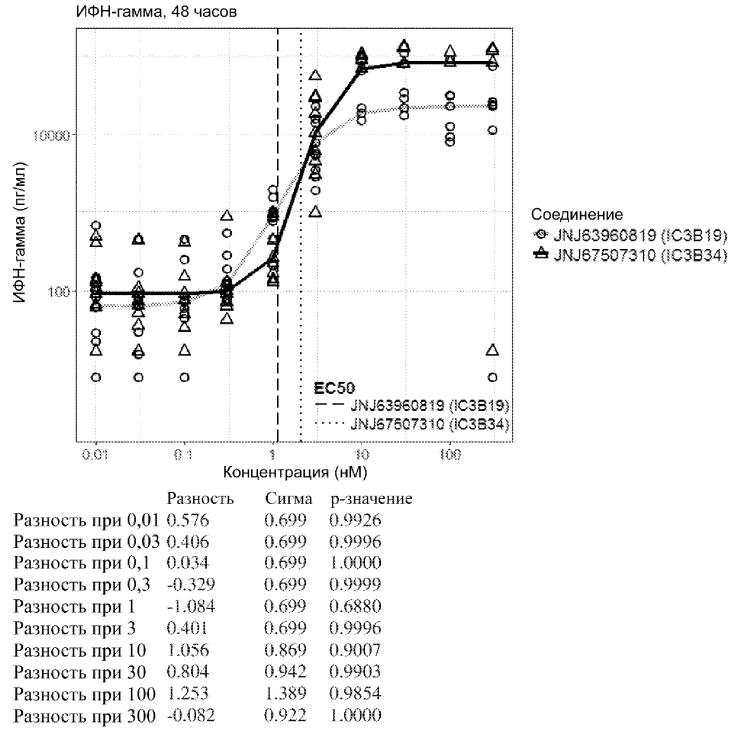
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.220	0.927	1.0000
Разность при 0,03	0.448	0.927	0.9991
Разность при 0,1	0.225	0.927	1.0000
Разность при 0,3	-0.735	0.927	0.9718
Разность при 1	-1.596	0.927	0.4007
Разность при 3	-0.836	0.927	0.9413
Разность при 10	-0.060	1.123	1.0000
Разность при 30	0.538	1.123	0.9992
Разность при 300	1.510	1.206	0.7439

Фиг. 52А

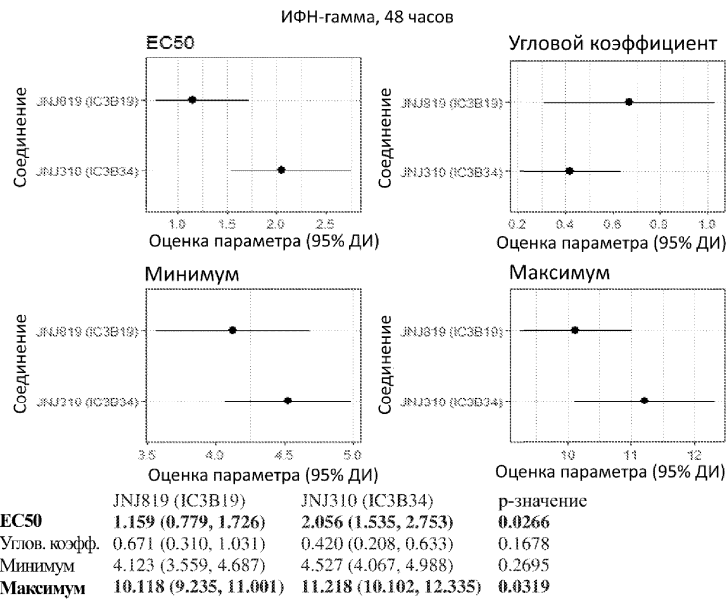


	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
<b>EC50</b>	<b>1.037 (0.693, 1.553)</b>	<b>2.304 (1.552, 3.420)</b>	<b>0.0065</b>
Углов. коэфф.	0.722 (0.358, 1.087)	0.617 (0.268, 0.966)	0.6920
Минимум	4.007 (3.317, 4.697)	4.335 (3.760, 4.909)	0.4644
Максимум	11.258 (10.434, 12.083)	11.952 (10.597, 13.307)	0.3179

Фиг. 52В

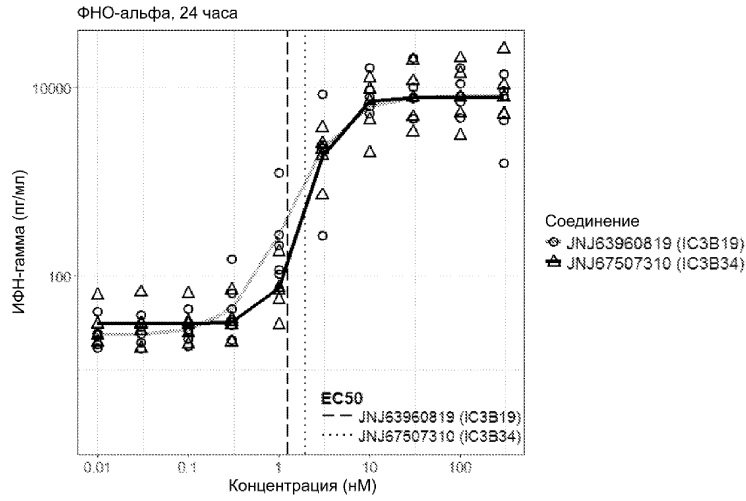


Фиг. 53А



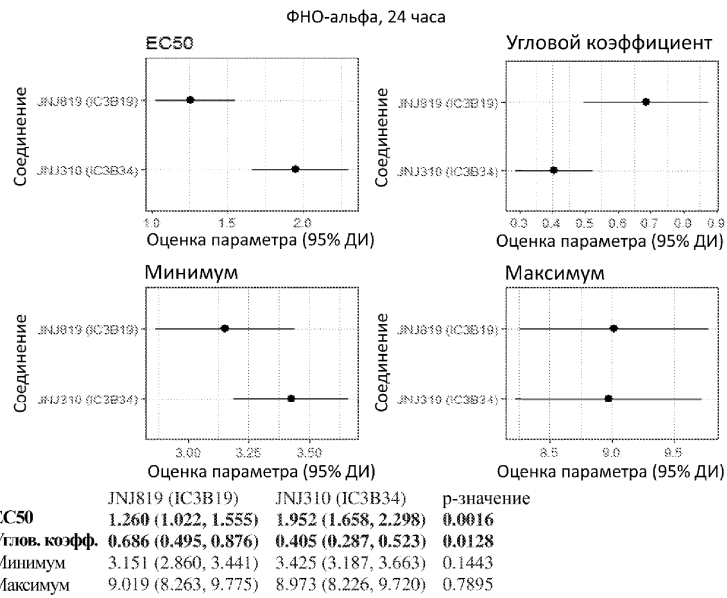
Фиг. 53В

045935

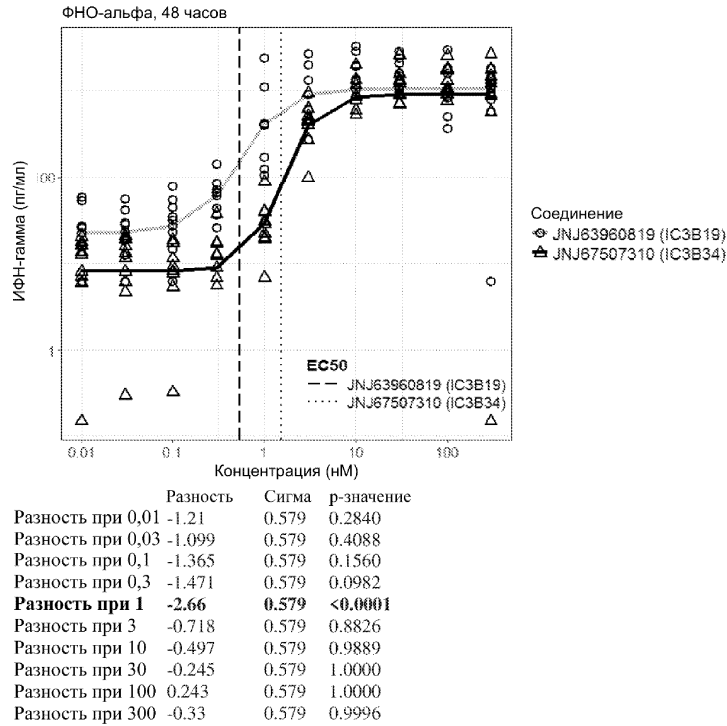


	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.242	0.53	0.9997
Разность при 0,03	0.233	0.53	0.9998
Разность при 0,1	0.203	0.53	0.9999
Разность при 0,3	-0.362	0.53	0.9918
Разность при 1	-1.258	0.53	0.1120
Разность при 3	0.035	0.53	1.0000
Разность при 10	-0.446	0.53	0.9660
Разность при 30	-0.175	0.53	1.0000
Разность при 100	-0.058	0.53	1.0000
Разность при 300	0.521	0.53	0.9172

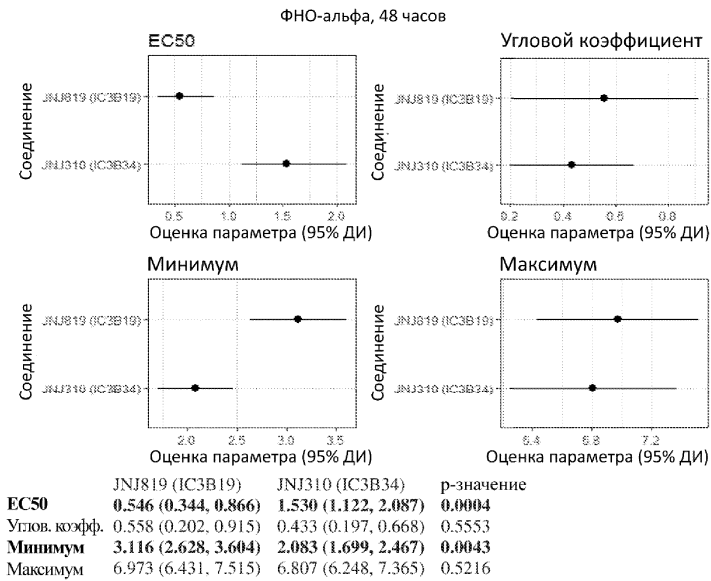
Фиг. 54А



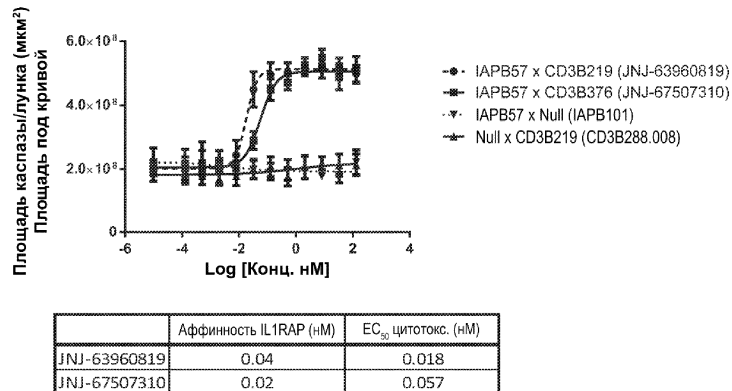
Фиг. 54В



Фиг. 55А

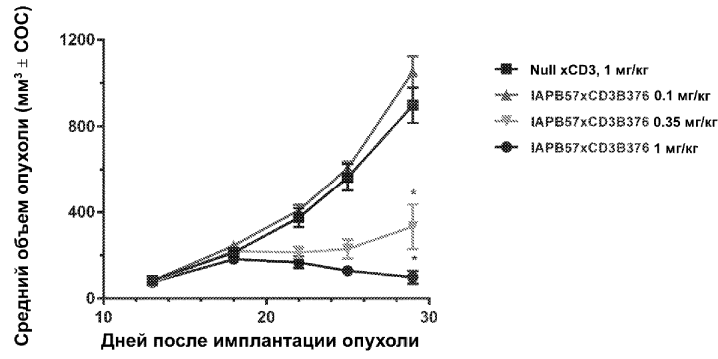


Фиг. 55В

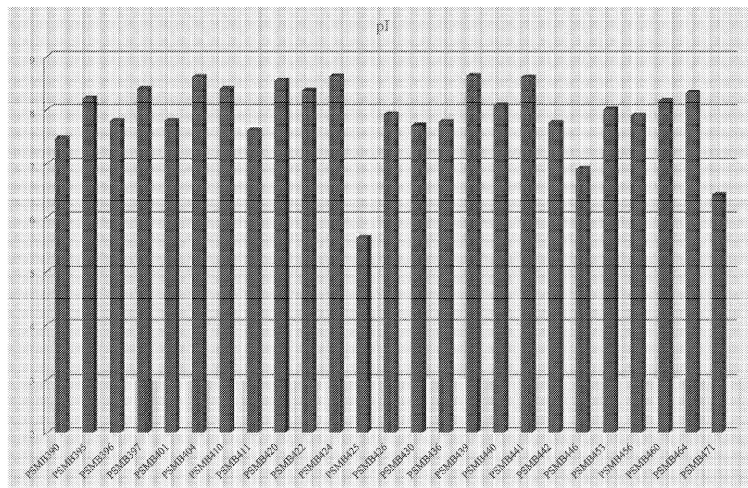


Фиг. 56

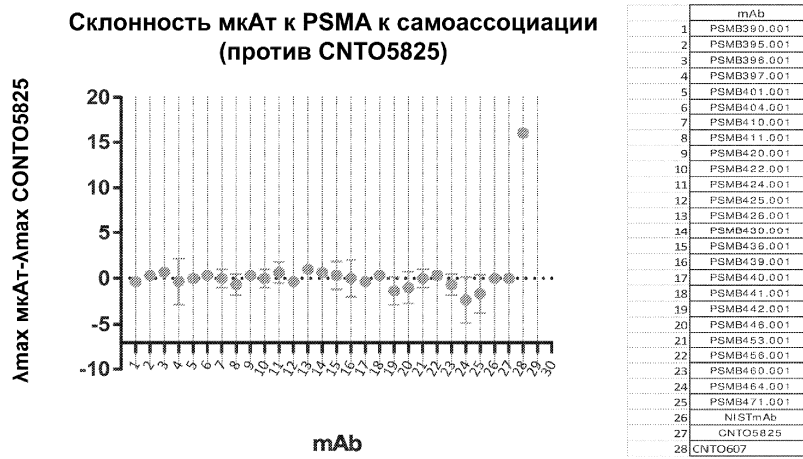
045935



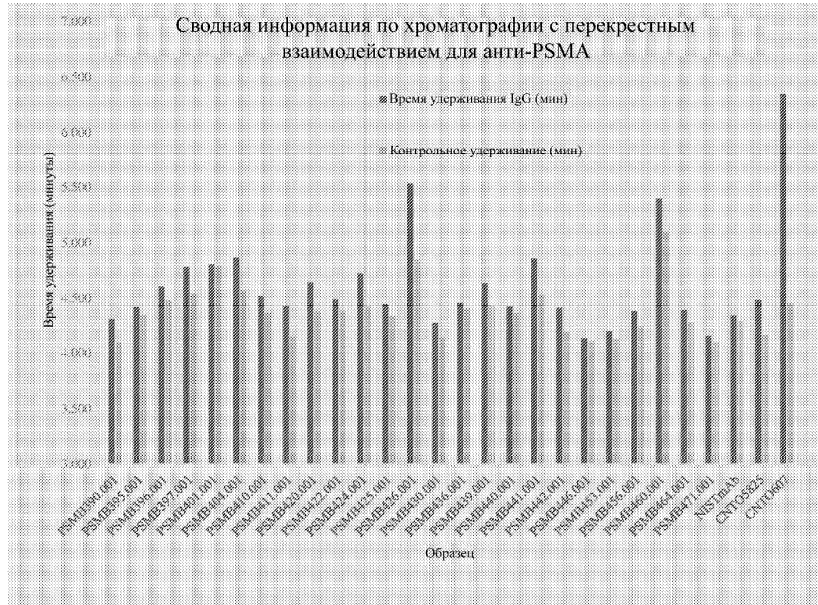
Фиг. 57



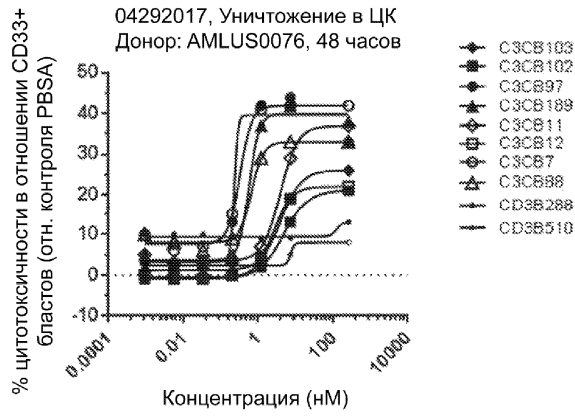
Фиг. 58



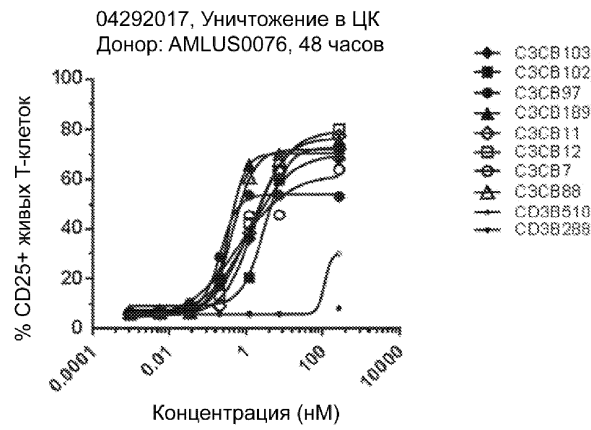
Фиг. 59



Фиг. 60

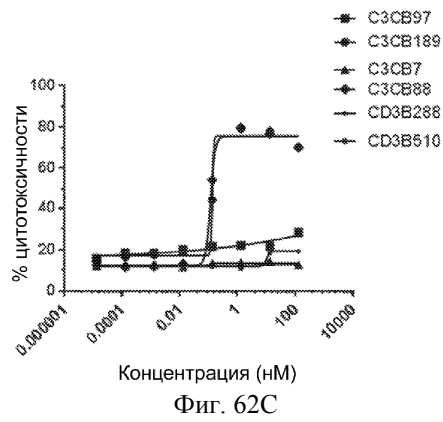
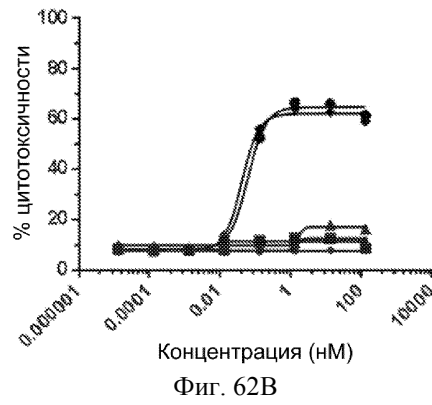
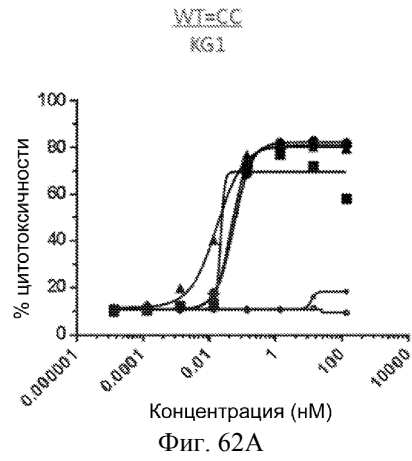


Фиг. 61А

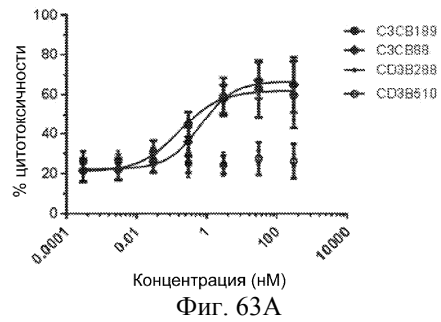


Фиг. 61В

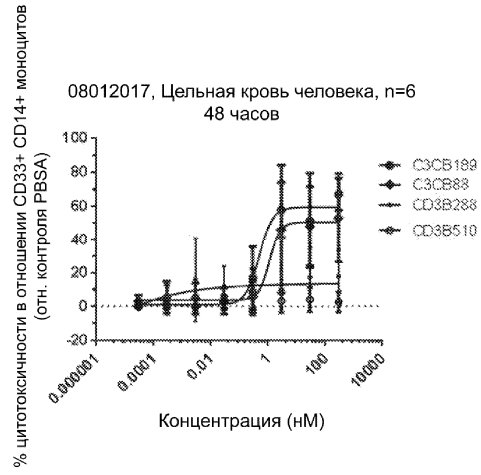
045935



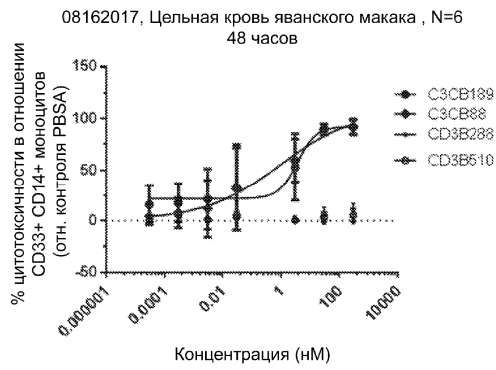
08012017, MOLM13 в нормальной человеческой крови  
48 часов, Е:Т 1:5



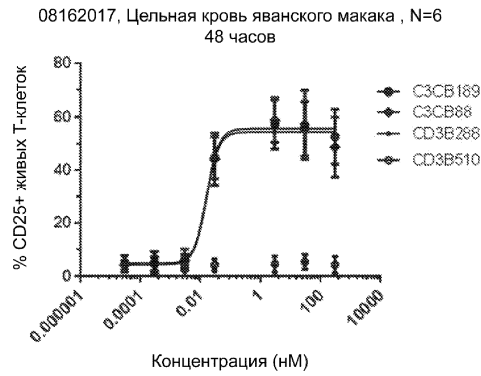




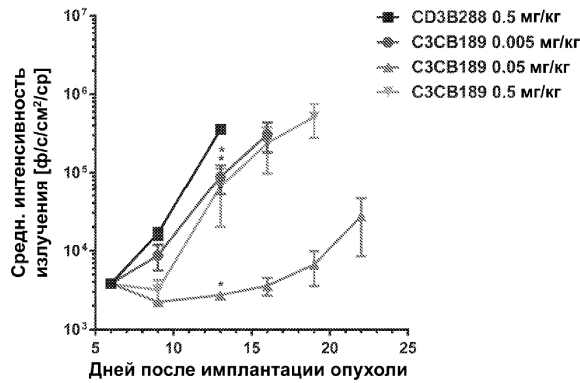
Фиг. 63В



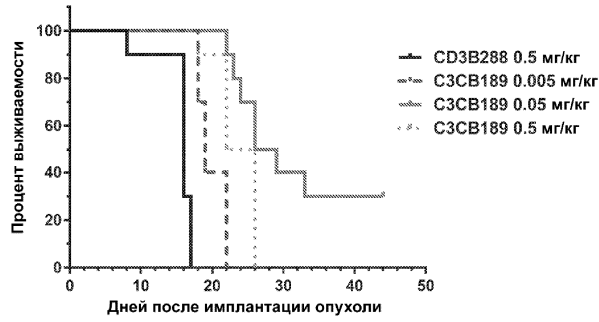
Фиг. 64А



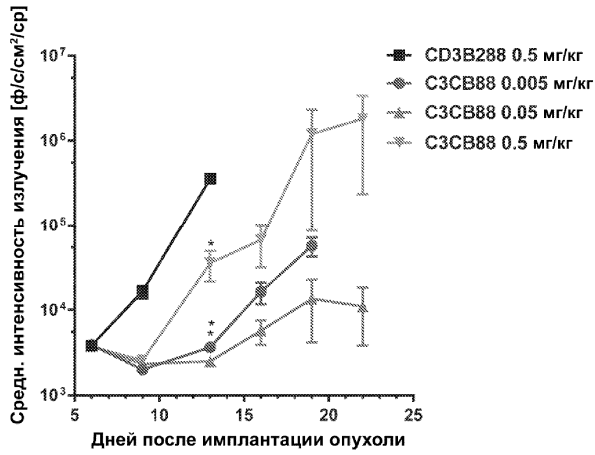
Фиг. 64В



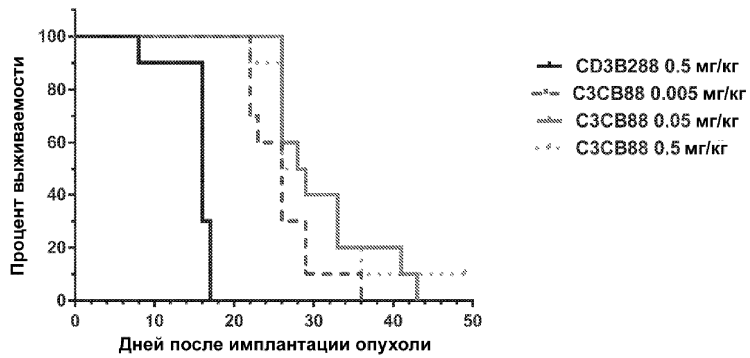
Фиг. 65



Фиг. 66



Фиг. 67



Фиг. 68

```

25 EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
27 EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFS
87 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
89 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
*****

25 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY
27 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTSY
87 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY
89 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY
*****

25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
27 ADSVKGRFTISRDNNTLYLQMSLRAED
87 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAED
89 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
*****

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
27 TAVYYCARMPLNSPHDCWGQGLVTVSS
87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
**

```

Фиг. 69

```

28 AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
30 AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
88 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
90 AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
*****

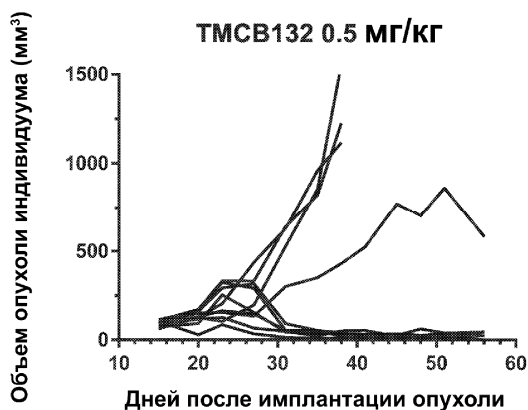
28 NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
30 NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
88 NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
90 NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
*****

28 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQ
30 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQ
88 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQ
90 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQ
*****

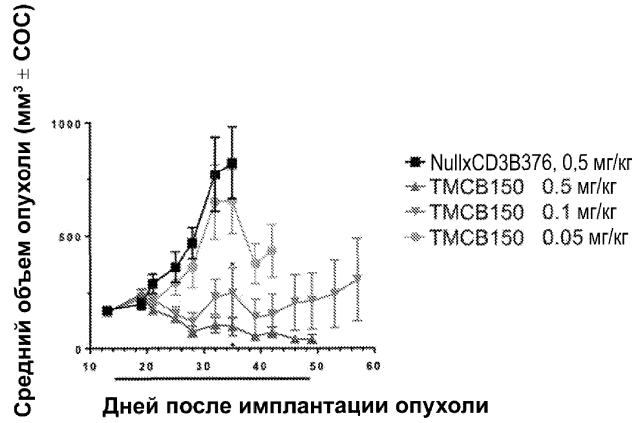
28 DYNYSLTFGGGTKVEIK
30 DYNYSLTFGGGTKVEIR
88 DYNYSLTFGGGTKVEIK
90 DYNYSLTFGGGTKVEIK
****

```

Фиг. 70

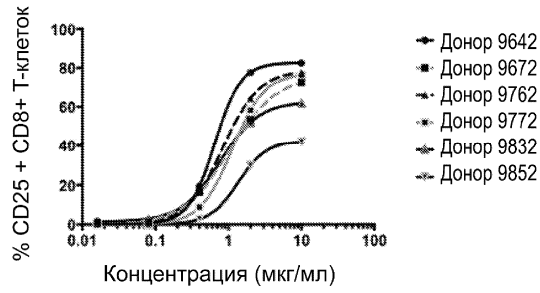


Фиг. 71



\* $P \leq 0.0001$  для контроля относительно лечения, рассчитанного с помощью линейного анализа смешанных эффектов с последующими парными сравнениями. Столбец под осью X представляет период введения доз

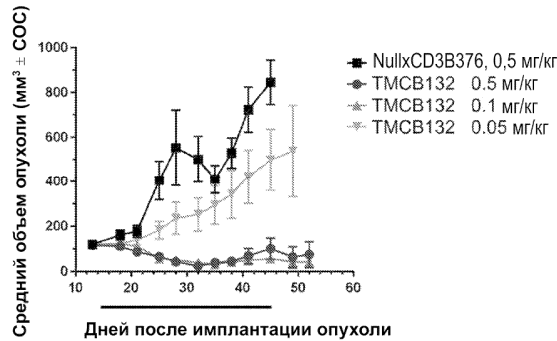
Фиг. 72



Фиг. 73



Фиг. 74



Фиг. 75

